

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
**Facultad de Ciencias Biológicas**



***Filogeografía, filogenia y especiación críptica en los  
Hormogastridae***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

DANIEL FERNÁNDEZ MARCHÁN

Bajo la dirección de los doctores

Darío J. Díaz Cosín  
Marta Novo Rodríguez  
Rosa María Fernández García

Madrid, 2018



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



***Filogeografía, filogenia y especiación críptica en los  
Hormogastridae***

Memoria que presenta

**DANIEL FERNÁNDEZ MARCHÁN**

para optar al grado de Doctor

por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 3 de Abril de 2017'





DARÍO J. DÍAZ COSÍN, PROFESOR EMÉRITO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Y LAS DOCTORAS MARTA NOVO RODRÍGUEZ Y ROSA MARÍA FERNÁNDEZ GARCÍA, INVESTIGADORAS POSTDOCTORALES, CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada '*Filogeografía, filogenia y especiación críptica en los Hormogastridae*', que para optar al Título de Doctor en Biología presenta Daniel Fernández Marchán, ha sido realizada en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra dirección. Y considerando que representa trabajo de Tesis, autorizamos su presentación a la Junta de Facultad.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado.

Madrid, 3 de Abril de 2017'.

Darío J. Díaz Cosín      Marta Novo Rodríguez      Rosa María Fernández García

Daniel Fernández Marchán



La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por un Contrato de Personal Investigador en Formación concedido por la Universidad Complutense de Madrid y el Banco Santander

Los estudios realizados han sido financiados por los proyectos nacionales  
CGL2010-16032  
y CGL2013-42908-P.

# Agradecimientos

Como en la mayoría de las historias, quizás sea más fácil empezar por dónde comenzó todo. Y el camino de esta tesis comenzó en una familia de cuatro, donde siempre sobró el cariño y donde nunca me faltó todo lo que necesité para centrarme en algo que nunca dejó de llamarme la atención: cómo funcionaba el mundo a mi alrededor. Mamá, no sé si lo recuerdo por mí mismo, o si recuerdo cómo me lo has contado tantas veces con una sonrisa; pero cuando te pedía que me leyeras mis libros de dinosaurios y tú lo hacías con tanta paciencia, estabas empezando todo esto. Es sólo un pequeño ejemplo de cómo me has ido ayudando a convertirme en quien soy hoy, porque buena parte de lo que valoro de mí mismo, sé que viene de ti. Papá, nunca tuviste miedo de arremangarte para hacer cualquier cosa que necesitáramos, pero ¿quién iba a imaginar que terminarías cogiendo la azada y buscando lombrices conmigo, desde Madrid hasta Alicante? Esos viajes de muestreo se han convertido en algunos de mis recuerdos favoritos. Como nuestros debates, a veces tan intensos que asustaban a mamá: puede que a menudo no hayamos estado de acuerdo, pero tu manera de ver la vida me ha enseñado a ser crítico, y a buscar la verdad más allá. Ambos habéis estado ahí siempre que lo he necesitado: cuando elegí la Biología por encima de otras carreras donde ahora seguramente tendría un trabajo bien remunerado, cuando elegí hacer esta Tesis en vez de escoger un camino más fácil. Ahora se abre un camino por delante que da aún más miedo que todas las anteriores decisiones juntas, pero estoy tranquilo porque sé que seguís cada uno con una mano sobre mis hombros. Y Alberto, no te vas a quedar fuera, aunque a veces no te haya puesto en el lugar que te mereces. Desde una distancia prudente me has visto crecer, y yo a ti. Siempre he tenido a alguien a quien mirar para saber cómo me podía convertir en alguien generoso,

noble y trabajador. Y cada vez que te has empeñado en que hiciera algo, lo hacías sabiendo que era lo mejor para mí: me has hecho esforzarme, enfrentarme a mis miedos y mis limitaciones, y me has hecho mejor. No sé si quien nos vea desde fuera podrá verlo, pero estoy muy orgulloso de tenerte por hermano. A los tres, y os lo he dicho menos de lo que debería: os quiero.

Pero también hubo otro inicio de la historia. En la Facultad de Biología. Un profesor me transmitió su pasión por la zoología, la filogenia y, quien lo iba a decir, ¡las lombrices de tierra! Me dio la oportunidad de trabajar a su lado, de aprender todo cuanto él sabía, que no es poco. Nunca me ha faltado su criterio cuando lo necesitaba, ni libertad y confianza cuando mis derroteros se escapaban de sus conocimientos. Desde el primer día fuiste como un padre científico para mí Darío: gracias por dejarme escribir esta Tesis sobre un tema tan bonito como éste, y gracias por permitir que haya sido posible.

En esos inicios también estuvieron dos personas que han sido claves en mi vida científica. Rosa, me enseñaste a manejar en el laboratorio de molecular, pero también a muestrear en el campo en las condiciones más difíciles. Me enseñaste un rigor y una disciplina que ya nunca van a dejar de ser parte de mí. Y aún desde lejos, me has hecho esforzarme al máximo: quizás hayas sido la más crítica con mis trabajos, pero con ello me has ayudado a mejorarlos una y otra vez. Marta, cederme tus queridos hormogástridos ha sido uno de los mayores regalos (quiero pensar que sólo ha sido un préstamo) más grandes que nadie ha tenido conmigo. El entusiasmo con el que siempre recibías mis ideas, el apoyo que a menudo ha sido más de amiga que de codirectora, han hecho que nunca me haya sentido solo en momentos difíciles. A las dos, infinitas gracias: si me he convertido en algo que se parezca de lejos a un buen científico, os lo debo en buena parte a vosotras.

En la Universidad he tenido una segunda familia, que no me ha tratado peor que la de sangre. Puedo mencionar a mucha gente, y otros que quedarán fuera se lo merecen

igualmente. Pero no puedo dejar de agradecer a Dolores, Mónica, Juan, Carmen, Pablo, Fernando y Jesús lo bien que me han tratado desde que simplemente era su alumno de Biología. Dolores, Fernando y Pablo, sin vuestras contribuciones nunca habría podido escribir esta tesis, y por ello parte de ella es vuestra: cada uno sabéis la parte que os toca. He conocido a muchos compañeros de faenas en el Departamento, y por culpa del escudo que suelo llevar por delante allá donde voy muchos apenas habrán llegado a conocerme a mí. Hay dos personas con las que he podido levantar un poco la barrera; sé que ellas comprenden como soy y han aprendido a aceptarme tal como soy. Irene, muchas gracias por las horas que hemos pasado juntos, por sacarme un poco de mi ensimismamiento, por tus ganas de aprender. Estos años de mi tesis han sido mucho más fáciles teniéndote en la silla de al lado. Y Nuria, no sé si te diste por aludida pero esto también va por ti. Poca gente me ha dado tanto recibiendo tan poco, por eso quiero que tú también estés aquí.

También conocí en la Facultad a una persona que poco a poco se fue abriendo camino en mi vida. Primero esa misteriosa chica que me cruzaba por los pasillos, luego una amiga que me regalaba sonrisas infinitas y de la que no quería separarme. Y más tarde, con más suerte de la que jamás me habría podido imaginar, mi amor, mi pareja, mi compañera. Lo más valioso que me han dado mis años en la Complutense y aquello que me gustaría mantener a mi lado toda la vida. Bea, gracias por hacerme el hombre más feliz del mundo, por hacerme sonreír cada vez que el resto de mi vida era gris, por llevarme de la mano más allá de donde pensaba poder llegar por mí mismo. Como aquel dibujo que me regalaste y me mira colgado en la pared de mi escritorio has estado en cada paso que he dado. Somos uno, ¿recuerdas?

Por último y no menos importante, estáis mis mejores amigos, Javi, Fausto, Fer. Si alguna vez consigo convenceros de que os leáis este tostón (bueno, al menos los agradecimientos) quiero que os encontréis aquí, entre los que habéis hecho mi vida más fácil estos cinco años.

En resumen, y porque sé que habrá gente que se eche en falta en estas páginas (por adelantado, me disculpo), gracias a todos los que habéis tenido fe en mí y me habéis tenido en vuestro pensamiento de vez en cuando.

# Índice

Resumen.....	pág. 14
Abstract.....	pág. 17
Capítulo I. Introducción	
I.1 Generalidades.....	pág. 20
I.2 La familia Hormogastridae.....	pág. 23
I.3 Cuestiones abiertas tras Novo (2010).....	pág. 29
I.4 Hipótesis y nuevas aproximaciones metodológicas.....	pág. 32
I.5 Objetivos.....	pág. 38
Publicaciones incluidas en la tesis.....	pág. 41
Capítulo II: Nueva luz sobre el enigma hormogástrido: descripción morfológica y molecular de <i>Hormogaster joseantonioi</i> n. sp. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae).....	pág. 43
Capítulo III: Prediciendo micro-variables del suelo y la distribución de una especie de lombriz de tierra endogea a través de un modelo basado en variables a gran escala..	pág. 61
Capítulo IV: Inferencias macroecológicas en fauna del suelo a través de modelización comparada de nicho: el caso de Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta).....	pág. 73
Capítulo V: Evaluando presiones evolutivas y señal filogenética en lombrices de tierra: un caso de estudio. El número de láminas del tiflosol en Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta).....	pág. 88
Capítulo VI: Caracteres crípticos para taxones crípticos: sobre la utilidad taxonómica de las quetas genitales en lombrices de tierra (Oligochaeta, Hormogastridae).....	pág. 112
Capítulo VII: Ubicando fronteras crípticas: Filogeografía a pequeña escala y paisaje genético del complejo de especies <i>Hormogaster elisae</i> (Oligochaeta, Hormogastridae).....	pág.130



Capítulo VIII: Revisión sistemática integrativa de una familia de lombrices de tierra mediterránea:

Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta).....pág. 178

Discusión general.....pág. 246

Conclusiones.....pág. 251

Bibliografía introducción y discusión.....pág. 255

## Resumen

Hormogastridae Michaelsen, 1900 es una familia de lombrices de tierra endémica del Mediterráneo Occidental con 32 especies y subespecies descritas de tamaños mediano a gigante. Mientras que su biología y ecología son poco conocidos, sus relaciones filogenéticas han recibido una atención significativa en la última década. Empleando técnicas moleculares, los trabajos de Novo y colaboradores alrededor de 2010 destacaron la necesidad de una revisión sistemática de la familia debido a la no-monofilia de su género principal *Hormogaster*, y también descubrió la diversidad críptica de la morfoespecie *H. elisae*.

Esta tesis identifica las principales cuestiones abiertas por los trabajos anteriormente mencionados, y propone nuevas aproximaciones conceptuales y metodológicas para incrementar nuestro conocimiento del grupo.

En el **Capítulo II** se describe una nueva especie (*Hormogaster joseantonioi*) is described: su posición filogenética como taxón hermano del complejo *Hormogaster elisae* matiza el aislamiento geográfico de esta última en el centro de la Península Ibérica y esclarece la posible ruta de colonización de su área de distribución actual. Esta especie mostró también combinaciones de caracteres internas desconocidas previamente, ampliando nuestra comprensión de la diversidad morfológica en hormogástridos.

En el **Capítulo III** se implementa con éxito la modelización de nicho ecológico mediante MaxEnt al complejo *H. elisae*. Su poder predictivo queda demostrado por su capacidad de asignar valores de idoneidad significativamente más alto a las localidades de presencia frente a las localidades de ausencia, y por la correlación entre las variables predictoras a gran escala y las micro-variables del suelo de relevancia biológica.

Estos hallazgos conducen al **Capítulo IV**, en el que se obtienen modelos de nicho ecológico para los cuatro clados principales en Hormogaster y se comparan cuantitativamente usando ENMtools.

Estos análisis muestran preferencias ecológicas diferentes para los clados, así como diferenciación estadísticamente significativa entre sus nichos ecológicos. La caracterización ecológica de los clados se considera como soporte al estatus genérico de dichos clados.

El **Capítulo V** intenta explicar la evolución y radiación del tiflosol multilamelar de Hormogastridae estudiando la correlación de su número de laminillas con variables morfológicas y ambientales utilizando el método filogenético comparado. El incremento del peso corporal aparece como la presión evolutiva principal tras el incremento en laminillas del tiflosol, contradiciendo la hipótesis previa de la asociación entre suelos pobres en nutrientes y la mayor complejidad del tiflosol. Los análisis también mostraron la fuerte señal filogenética del peso corporal promedio y el número de laminillas del tiflosol, apuntando a la utilidad de estos caracteres en la sistemática de Hormogastridae.

En el **Capítulo VI** se evalúa un prometedor carácter morfológico, las quetas genitales de Hormogastridae, en busca de información filogenética a diferentes niveles taxonómicos usando microscopía electrónica de barrido. Diferencias morfológicas cualitativas entre los clados principales de Hormogastridae sugieren relaciones filogenéticas supraespecíficas, mientras que diferencias de forma (analizadas por morfometría geométrica) separan los linajes crípticos de *H. elisae* entre sí.

En el **Capítulo VII** se lleva a cabo un estudio filogeográfico a escala fina del complejo *H. elisae*, basado en un denso muestreo entre las áreas de distribución de sus linajes. Se encuentra un claro aislamiento geográfico de los linajes crípticos, sin señales de flujo génico a través de estrechas fronteras de menos de un kilómetro. La baja capacidad

dispersive active y la presencia de barreras ecológicas y bióticas se proponen como posibles causas del aislamiento, junto con indicios de aislamiento reproductivo. Un intento de mejorar el marco temporal de la diversificación del complejo proporciona algunas hipótesis sobre la influencia de los eventos paleogeográficos en la historia evolutiva de *H. elisae*.

**El Capítulo VIII** acomete la revisión sistemática integrativa de la familia Hormogastridae, incorporando una matriz de caracteres morfológicos reevaluados a análisis de evidencia total y evaluando la utilidad de la microtomografía computarizada ( $\mu$ CT) para el estudio morfológico comparado de lombrices de tierra. Tras encontrar fuerte soporte y estados de carácter autapomórficos para los principales clados de Hormogastridae, se proporciona un nuevo sistema de géneros incluyendo diagnósis morfológicas e información biogeográfica y ecológica. *Ailoscolex* se incorpora formalmente a la familia, *Vignysa*, *Xana* y *Hemigastrodrilus* se mantienen y *Hormogaster* da lugar a cuatro nuevos géneros adicionales: *Boucheona*, *Carpetania*, *Diazcossinia* e *Ilithyia*.

# Abstract

Hormogastridae Michaelsen, 1900 is a Western Mediterranean earthworm family with 32 described species/subspecies of medium to giant body size. While their biology and ecology are poorly known, their phylogenetic relationships received significant attention in the last decade. Employing molecular techniques, the works of Novo and collaborators around 2010 highlighted the necessity of a systematic revision of the family due to the non-monophyly of the main genus *Hormogaster*, and also uncovered the cryptic diversity of the morphospecies *Hormogaster elisae*.

This thesis identifies the main standing questions raised by the aforementioned works, and proposes new conceptual and methodological approaches to increase our knowledge of the group.

In **Chapter II** a new species (*Hormogaster joseantonioi*) is described: its phylogenetic position as sister taxon to the *Hormogaster elisae* complex bridges the geographic isolation of the latter in the center of the Iberian Peninsula and sheds light into the possible colonization route of their current range. This species also showed previously unknown combinations of internal character states, widening our understanding of hormogastrid morphological diversity.

In **Chapter III** ecological niche modelling through MaxEnt is implemented successfully to the *H. elisae* complex. Its predictive power is demonstrated by the ability of assigning significantly higher suitability values to presence localities than to absence localities, and by the correlation between the large scale predictor variables and biologically relevant micro-scale soil variables. These findings lead to **Chapter IV**, in which ecological niche models are obtained for the four main clades within *Hormogaster* and compared quantitatively using ENMtools. These analyses show differential ecological preferences for the clades and statistical differentiation between their ecological niches. The

ecological characterization of the clades is regarded as support for the genus status of the aforementioned clades.

**Chapter V** attempts to explain the evolution and radiation of the multilamellar typhlosole of Hormogastridae by studying the correlation of its number of lamellae to morphological and environmental variables using the phylogenetic comparative method. Increasing body weight is suggested as the main evolutionary pressure explaining the increase in typhlosole lamellae, contradicting the standing hypothesis of nutrient-poor soils being associated with more complex typhlosoles. The analyses also showed the strong phylogenetic signal of average body weight and number of typhlosole lamellae, pointing to the usefulness of these characters in Hormogastridae systematics.

In **Chapter VI** a promising morphological character, the genital chaetae of Hormogastridae, is evaluated for phylogenetic information at different taxonomic levels using scanning electron microscopy. Qualitative morphological differences between the main clades of Hormogastridae suggest supraspecific phylogenetic relationships, while differences in shape (analyzed by geometric morphometrics) separate the cryptic lineages of *H. elisae*.

In **Chapter VII** a fine-scale phylogeographic study of the *H. elisae* complex is performed based on a dense sampling between the ranges of its lineages. Clear geographic isolation of the cryptic lineages is found, with no hints of gene flow across narrow borders of less than one kilometer. Limited active dispersal ability and the presence of ecological and biotical barriers are proposed as possible causes of the isolation, together with hints of reproductive isolation. An attempt to achieve an improved temporal frame for the diversification of the complex provided some hypothesis about the influence of paleogeographic events in the evolutionary history of *H. elisae*.

**Chapter VIII** undertakes the integrative systematic revision of the family Hormogastridae, incorporating a matrix of revaluated morphological characters into total evidence analyses and evaluating the usefulness of microcomputed tomography ( $\mu$ CT) for comparative morphological studies in earthworms. After strong support and autapomorphic character states are found for the main clades of the family, a revised genera system for the family is provided, including morphological diagnoses, biogeographical and ecological information. *Ailoscolex* is formally added to the family, *Vignysa*, *Xana* and *Hemigastrodrilus* are retained and *Hormogaster* gives rise to four new additional genera: *Boucheona*, *Carpetania*, *Diazcosinia* and *Ilithyia*.

# **I. Introducción**

## **I.1. Generalidades**

Desde el agricultor más lego al zoólogo más experto, es ampliamente conocida la importancia de las lombrices de tierra (Annelida, Oligochaeta, Crassiclitellata) para el buen funcionamiento de los ecosistemas edáficos. Este conocimiento se extiende desde la Antigüedad (babilonios, griegos o egipcios nos han dejado testimonio de ello) pasando por la Inglaterra Victoriana, cuando Charles Darwin puso a las lombrices de tierra en el centro de su mente inquisitiva, culminando en uno de los primeros tratados científicos sobre su papel en los ciclos del suelo (“The formation of vegetable mould through the action of worms” Darwin 1881).

Así, lo que era un conocimiento casi instintivo pasó a estar basado en observaciones y hechos: estos Ingenieros del Ecosistema (Lavelle *et al.* 1997) modifican la estructura del suelo, mezclan sus horizontes, modifican la infiltración del agua e intervienen de forma activa en los ciclos de los nutrientes (Barley 1958, Lee 1985, Lavelle 1988, Parmelee *et al.* 1990, Zhang y Hendrix 1995, Ernst *et al.* 2009 entre otros). Tal es la influencia de estos animales en el medio que rodea a sus galerías que éste ha llegado a conocerse como drilosfera (drilos=lombriz) (Brown *et al.* 2000), y los efectos beneficiosos de su actividad para el ser humano son considerados servicios ecosistémicos (recopilados en Blouin *et al.* 2013). Dado que la actividad de las lombrices de tierra afecta al crecimiento y desarrollo de la vegetación (Decaëns *et al.* 2003, Scheu 2003, Kreuzer *et al.* 2004, Kim *et al.* 2015, Clause, Barot y Forey 2016) se ha prestado gran atención a los posibles beneficios de su presencia en la productividad agrícola (Blouin, Barot y Lavelle 2006, Bertrand *et al.* 2015, Johnston *et al.* 2015). No obstante, su acción es relevante incluso en suelos urbanos (Amossé *et al.* 2015).



A pesar de todo esto, la diversidad y relaciones evolutivas de las lombrices de tierra son uno de los grandes olvidados tanto en el imaginario popular como entre los taxónomos. Y aunque pueda no parecer evidente, el conocimiento de aquellas es muy relevante para entender el funcionamiento y el mantenimiento de sus valiosos servicios ecosistémicos. Se ha demostrado que las tres categorías ecológicas (epigeas, endogeas y anécicas) tienen diferentes efectos sobre el medio edáfico (Sheehan *et al.* 2008, Speratti y Whalen 2008 , Ernst *et al.* 2009, Laossi *et al.* 2009) y a su vez responden de modo diferente a las perturbaciones (Simonsen *et al.* 2010). Es más, existen indicios de que distintas especies de lombriz de tierra muestran diferencias en su papel como bioindicadores de la calidad del suelo (Nahmani, Lavelle y Rossi 2006) su respuesta a prácticas agrícolas (Muir *et al.* 2007, Capowiez *et al.* 2009, De Oliveira, Bertrand y Roger-Estrade 2012) o a la bioacumulación de metales pesados (Hobbelen, Koolhaas y Van Gestel 2006) y herbicidas (Tejada *et al.* 2016). Otro aspecto interesante es la competencia entre distintas especies (Dalby, Baker y Smith 1998), destacando la interacción entre las especies nativas y exóticas (Winsome *et al.* 2006, Kim *et al.* 2015, Boyer *et al.* 2016). Este último pone de manifiesto la importancia de incluir a las lombrices de tierra en los planes de conservación de fauna, lo que se ha limitado casi exclusivamente a la lombriz gigante australiana *Megascolides australis* (Van Praagh y Yen 2010).

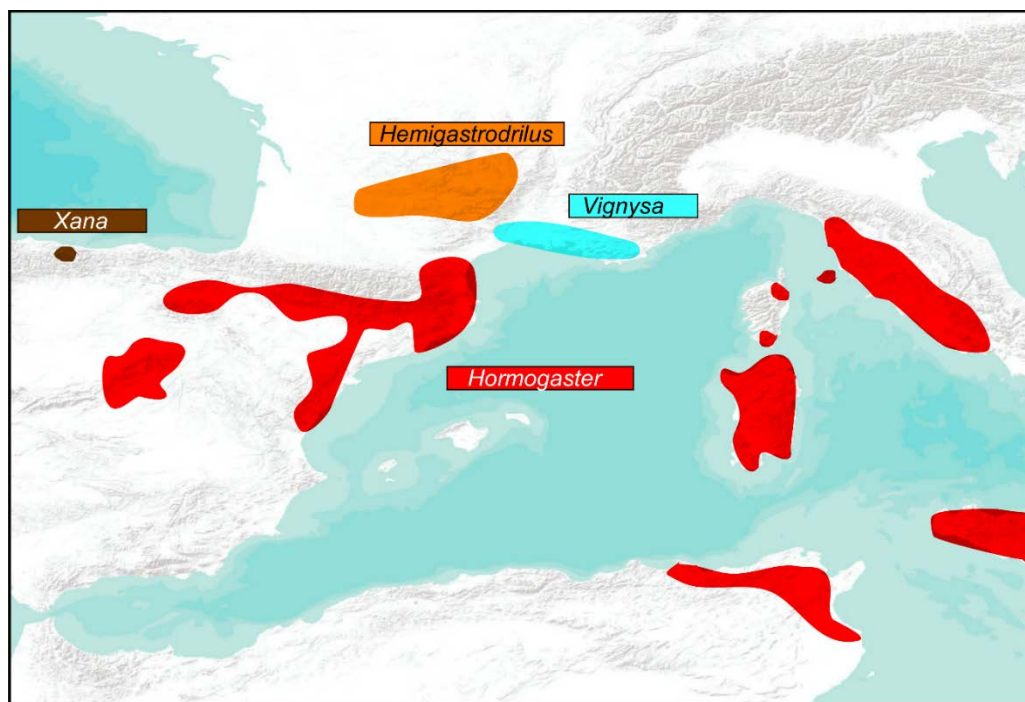
En la región Mediterránea occidental confluyen dos aspectos que la hacen especialmente relevante para el estudio de las lombrices de tierra. Por un lado, la riqueza de especies presente en la Península Ibérica, Francia e Italia (incluyendo estas últimas Córcega y Cerdeña) (Bouché 1972, Cosín, Trigo y Mascato 1992, Qiu y Bouché 1998, Omodeo y Rota 2008) sugiere que el foco de diversificación de estos animales en la región Paleártica se podría situar entre ellos. Trabajos como Domínguez *et al.* (2015) o Novo *et al.* (2015)

han mostrado que los grupos más basales de las lombrices endémicas europeas están restringidos al área comprendida entre el sur de Francia, el Noreste de España, las islas Baleares, Córcega y Cerdeña, y otros como Fernández *et al.* (2016) han mostrado un patrón recurrente de diversificación de especies cosmopolitas a partir de esos territorios. Por otro lado, los ecosistemas mediterráneos se enfrentan a una serie de circunstancias y desafíos únicos ante la creciente antropización, sobreexplotación y aridificación, por lo que el papel de las lombrices de tierra para frenar estos procesos puede ser más importante de lo que creemos. Sus servicios ecosistémicos podrían ser esenciales para el mantenimiento de los ecosistemas naturales y para los sistemas agrícolas sostenibles manteniendo la riqueza de los suelos (Bescansa *et al.* 2010), reduciendo la erosión y estabilizando la estructura de los suelos (Garvín *et al.* 2001, Valckx *et al.* 2010) o bioacumulando pesticidas (Hobbelen, Koolhass y Van Gestel 2006).

En este contexto, la familia Hormogastridae Michaelsen, 1900 cobra gran relevancia.

## I.2. La familia Hormogastridae

El área de distribución de este grupo se restringe al Mediterráneo Occidental, estando presentes en España, Francia, Córcega, Cerdeña, Argelia, Túnez, Sicilia, las islas del mar Tirrénico y la Toscana (Italia continental) (figura 1).



**Figura 1.** Distribución de los géneros que componen la familia Hormogastridae.

Hormogastridae es la segunda familia de lombrices de tierra más diversa en el Paleártico occidental después de Lumbricidae Claus, 1876. Aunque algunas de sus especies son de tamaño pequeño (alrededor de 3 centímetros y 0,5 gramos) la mayoría son grandes, y algunas se pueden considerar gigantes (hasta 90 centímetros de longitud y 100 gramos de peso). Los hormogástridos tienen un papel ecológico relevante en la Cuenca Mediterránea occidental como endogeos excavadores profundos (Bouché 1972), aumentando la permeabilidad y la retención de agua de los suelos (Gil *et al.* 2007) y procesando grandes cantidades de suelo depositado como heces (Díaz Cosín *et al.* 1996) cuyos cambios físico-químicos y microbiológicos favorecen el crecimiento de la cubierta vegetal (Clause *et al.*

2013). Los hormogástridos pueden llegar a dominar en abundancia las comunidades de lombrices de tierra (por ejemplo en Cerdeña, Omodeo y Rota 2008) principalmente en suelos empobrecidos y afectados por la sequía estacional, condiciones a las que parecen estar bien adaptadas (Hernández 2005, Díaz Cosín *et al.* 2006).

El conocimiento de esta familia comenzó con la descripción de sus primeras especies a finales del siglo XIX: *Hormogaster redii* Rosa, 1887 y *Hormogaster pretiosa* Michaelsen, 1899. Varios autores fueron añadiendo nuevas especies a lo largo del siglo XX (Cognetti 1914, Bouché 1970, Zicsi 1970, Álvarez 1971, 1977, Díaz Cosín *et al.* 1989, Rota 1993, Qiu y Bouché 1998), y el siglo XXI ha traído la descripción de tres nuevos hormogástridos (Novo *et al.* 2012, Marchán *et al.* 2014 y Rota *et al.* 2016). Las 32 especies y subespecies conocidas actualmente se encuentran clasificadas en cuatro géneros: *Hormogaster* Rosa, 1887 (27 especies y subespecies), *Hemigastrodrilus* Bouché, 1970 (1 especie y 1 subespecie), *Vignysa* Bouché, 1970 (2 especies) y *Xana* Díaz Cosín, Briones and Trigo, 1989 (1 especie) (figura 2).



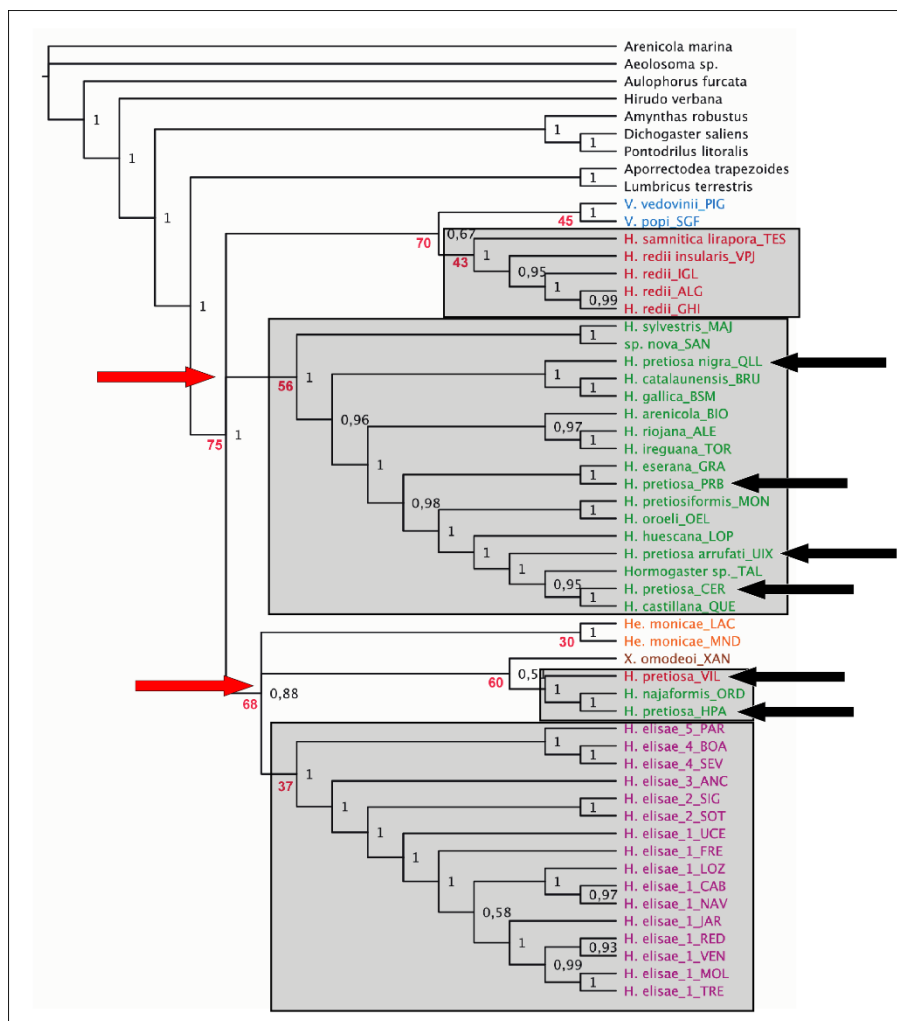
**Figura 2.** Algunos representantes de la familia Hormogastridae. a) *Xana omodeoi*, b) *Vignysa popi*, c) *Hemigastrodrilus monicae*, d) *Hormogaster elisae*, e) *Hormogaster castillana*, f) *Hormogaster pretiosa* (arriba) y *Hormogaster redii* (abajo).

La taxonomía de la familia Hormogastridae ha sido construida basándose principalmente en una serie limitada de caracteres morfológicos tradicionales en lombrices de tierra, propensos a mostrar variabilidad intrapoblacional, homoplasia y pobre señal filogenética (Briones *et al.* 2009). El trabajo de Cobolli Sbordoni *et al.* (1992) fue pionero en cuestionar el *status quo* al utilizar técnicas moleculares para estudiar las relaciones filogenéticas de los hormogástridos: mediante análisis electroforético de polimorfismos enzimáticos (uno de los primeros tipos de marcadores moleculares utilizados en Biología Molecular) obtuvieron estimas del grado de divergencia genética entre 10 poblaciones de 4 especies de la familia (*Hormogaster redii*, *Hormogaster samnitica* Cognetti, 1914, *Hormogaster pretiosa* y *Xana omodeoi* Díaz Cosín, Briones and Trigo, 1989). Basándose

en sus resultados, los autores sugirieron por primera vez que la morfoespecie *Hormogaster pretiosa* debería dividirse en tres especies diferentes.

La tesis doctoral de Marta Novo (2010) implementó el uso de las técnicas moleculares modernas (secuenciación de marcadores moleculares mitocondriales y nucleares) en la familia Hormogastridae, enfocando sus esfuerzos en dos direcciones principales.

La primera (reflejada en Novo *et al.* 2011) fue la resolución de las relaciones filogenéticas de la familia Hormogastridae mediante técnicas probabilísticas y de parsimonia de inferencia filogenética utilizando marcadores moleculares concatenados: mitocondriales- Citocromo C oxidasa subunidad 1 o COI, ARN ribosomal 16S, ARNs de transferencia Leu, Ala y Ser, y nucleares- ARN ribosomal 28S y 18S, histona H3 e histona H4. Este estudio incluyó por primera vez representantes de casi todas las especies descritas hasta la fecha. Los resultados revelaron importantes conflictos entre las relaciones filogenéticas inferidas y la clasificación tradicional de la familia (figura 3). La parafilia de *Hormogaster* mostró que había sido usado como un género cajón de sastre; sus especies se dividieron en cuatro clados monofiléticos, bien soportados y con divergencias profundas. Además, la especie *Hormogaster pretiosa* se recuperó como polifilética, probablemente debido a una descripción original incompleta (donde no figuraban dos de los caracteres clave en la sistemática de Hormogastridae) que llevó a la agrupación de poblaciones sin relación estrecha.



**Figura 3.** Modificada de Novo (2010) Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana a partir de la secuencia concatenada de marcadores moleculares (COI, 16S+tRNAs, 18S, 28S, H3, H4). Los cuadrados grises muestran la ubicación de las especies descritas en el género *Hormogaster*, las flechas negras indican las poblaciones descritas como *H. pretiosa*, y las flechas rojas señalan las politomías basales entre los grandes clados.

La segunda dirección principal de la tesis de Novo (reflejada en Novo *et al.* 2009, 2010) fue el estudio de varios aspectos de la biología de *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977, una especie distribuida por el centro de la Península Ibérica. La separación geográfica de las citas de esta especie (lo que contrasta con el área de distribución muy restringida de otros hormogástridos) y la variabilidad morfológica en el tamaño corporal levantaron sospechas que llevaron al estudio de su diversidad genética. Lo que se encontró fue una profunda divergencia genética de las poblaciones estudiadas (de una magnitud similar a la encontrada entre especies diagnosticadas morfológicamente) quedando agrupadas en

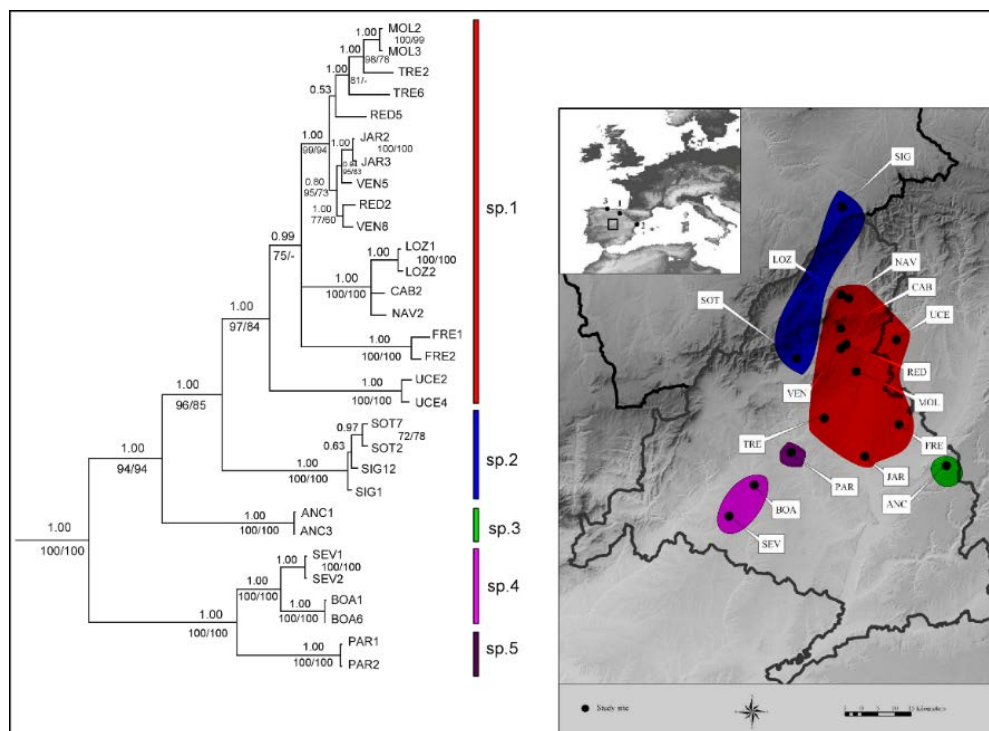
al menos cinco linajes que podrían describirse como especies crípticas: aquellas que han sido identificadas previamente como una sola por su homogeneidad en los caracteres diagnósticos.



### I.3. Cuestiones abiertas tras Novo (2010)

Aunque muy esclarecedores, estos avances en los conocimientos de la familia Hormogastridae dejaron abiertos algunos interrogantes, y plantearon otros nuevos.

El aislamiento geográfico del complejo *Hormogaster elisae* en el centro de la Península Ibérica, y la ausencia de parientes estrechamente relacionados en la familia Hormogastridae presentaban la incógnita de cuándo y desde dónde colonizó este linaje su área de distribución actual.



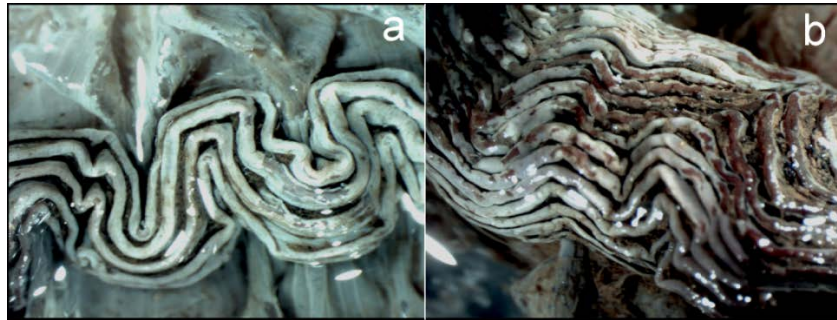
**Figura 4.** Modificada de Novo *et al.* (2010). Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana obtenido a partir de la secuencia concatenada de marcadores moleculares (COI, 16S+tRNAs 28S, H3) con los linajes crípticos identificados marcados en color y representados en el mapa del centro de la Península Ibérica.

A pesar de haberse identificado algunos de los linajes crípticos que componen *Hormogaster elisae* (figura 4), la mayoría de los aspectos de la diversificación de este grupo seguían sin esclarecer. El primero concernía a la filogeografía de los linajes: ¿se encuentran estos linajes aislados geográficamente entre sí, o sus áreas de distribución se

solapan? Este se relaciona con el segundo aspecto: ¿qué tipo de especiación explicaría la divergencia de los linajes crípticos? ¿Habría ocurrido en simpatría o alopatría? ¿Y cuáles podrían haber sido las causas evolutivas? Por último, con los datos disponibles hasta la fecha los autores fueron incapaces de delimitar especies crípticas a partir de los linajes encontrados. Novo *et al.* (2012) intentaron implementar uno de los métodos de delimitación de especies más utilizados desde aquellas fechas hasta la actualidad, conocido como Generalized Mixed Yules Coalescent-GMYC Pons *et al.* (2006). Este método suele aplicarse en conjunción con el marcador molecular COI, y se basa en la detección en un árbol ultramétrico (donde la longitud de las ramas es proporcional al tiempo) del cambio de tasa de diversificación típico de la especiación a la que caracteriza la separación de poblaciones. GMYC demostró ser ineficaz para la delimitación de especies en Hormogastridae, ya que sobreestimó (tanto con el marcador COI como con 16S) el número de especies: 56 frente a las 32 descritas, y más de 100 con el método de múltiples umbrales. El ejemplo más extremo es la separación en especies putativas distintas de individuos de la misma población.

La recopilación de datos morfológicos y de características del suelo en el conjunto de especies de la familia permitió a Novo (2010) plantearse cuestiones macroevolutivas. Una de ellas concernía a una de las estructuras más características de la familia Hormogastridae, el tiflosol multilamelar. El tiflosol es una invaginación longitudinal del tubo digestivo hacia su luz, que aparece en distintas familias de lombrices de tierra con morfologías variadas, y cuya función se cree asociada con el aumento de superficie funcional (Edwards y Bohlen 1996). En los hormogástridos el tiflosol se divide en laminillas longitudinales (figura 5), cuyo número es muy variable entre especies (llegando a 23 laminillas). Perel (1977) y James & Cunningham (1989) asociaron una mayor complejidad de la superficie intestinal a dietas de menor calidad en lombrices de tierra.

Esto llevó a la observación contraintuitiva de que *H. elisae*, que habita suelos más pobres en nutrientes que la mayoría de sus parientes, presentaba el menor número de laminillas en su tiflosol (5), cuando se esperaría lo contrario. ¿Cuál podría ser la explicación evolutiva a este fenómeno?



**Figura 5.** Algunos ejemplos de tiflosol multilamelar en Hormogastridae. a) Tiflosol de *Hormogaster elisae* (5 laminillas). b) Tiflosol de *Hormogaster castillana* (23 laminillas).

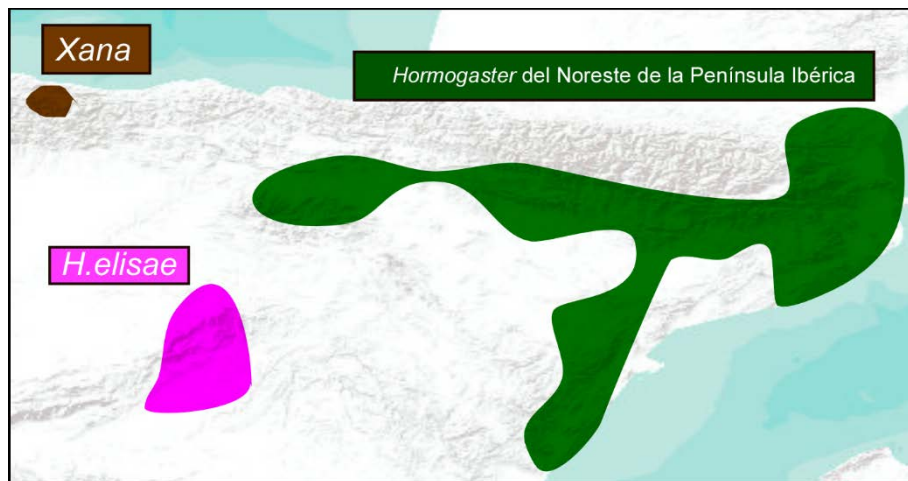
Por último, las nuevas hipótesis filogenéticas de la familia Hormogastridae planteaban la necesidad de una revisión sistemática. Novo (2010) ya adelantó algunas propuestas sobre el estatus específico o subespecífico de las especies descritas, pero varios aspectos quedaron sin formalizar por la falta de datos. Los marcadores moleculares utilizados habían sido incapaces de resolver las relaciones filogenéticas entre los grandes clados, obteniendo una gran politomía (figura 3). Además, algunas de las poblaciones citadas en la literatura como *H. pretiosa* no habían podido ser muestreadas o se carecía de información morfológica suficiente como para cerrar definitivamente la controversia sobre la verdadera identidad de esta especie conflictiva. Finalmente, antes de poder formalizarse un sistema de géneros monofiléticos y que reflejaran la historia evolutiva de la familia era necesario encontrar evidencias del estatus genérico de los grandes clados monofiléticos en los que se había separado *Hormogaster* (según su definición tradicional). No sólo eso; para poder establecer nuevos géneros (y apoyar los ya existentes) era necesario proporcionar caracteres diagnósticos para cada uno de ellos, pero no se habían encontrado caracteres morfológicos que separaran claramente estos grupos.

## I.4. Hipótesis y nuevas aproximaciones metodológicas

Tomando como punto de partida los interrogantes anteriores es posible plantear una serie de hipótesis que podrían ser contrastadas mediante muestreos adicionales y nuevas aproximaciones metodológicas.

### Nuevas estrategias de muestreo.

El territorio que separa el área de distribución del complejo *H. elisae* y los hormogástridos del Noreste de la Península Ibérica (la fuente más probable de colonización al ser el área con mayor diversidad - Novo 2010) (figura 6) no ha sido muestreado sistemáticamente en busca de lombrices de tierra. Las provincias de Zaragoza y Teruel podrían albergar especies sin describir que esclarecieran las relaciones filogenéticas de *H. elisae* con el resto de los clados, y la posible ruta seguida por el linaje ancestral en su expansión hacia el centro de la Península Ibérica.



**Figura 6.** Distribución del complejo *H. elisae* y de sus parientes en la Península Ibérica.

En el extremo opuesto, un muestreo a escala más fina entre los límites de las áreas de distribución de los linajes crípticos de *H. elisae* permitiría localizar áreas de contacto entre ellos, e investigar la presencia o ausencia de simpatria en dichas áreas (como en Vodă *et al.* 2015). En las áreas de contacto sería posible estudiar la presencia o ausencia de flujo

genético entre los linajes adyacentes, proporcionando evidencias indirectas de la existencia de aislamiento reproductivo. Una posibilidad interesante sería la realización de experimentos de cruzamiento en microcosmos con individuos pertenecientes a estos linajes, lo que podría proporcionar evidencias complementarias.

Todo esto, unido a un análisis filogeográfico detallado incluyendo un mayor número de poblaciones, permitiría establecer hipótesis sobre la diversificación y modo de especiación de estos linajes. La falta de un marco temporal aproximado para la diversificación del complejo dificulta la interpretación de este proceso evolutivo en un contexto paleogeográfico. Intentos anteriores de obtener árboles ultramétricos datados se han basado en el uso de eventos geológicos o de tasas evolutivas externas, dada la ausencia de fósiles de lombrices de tierra. Estos análisis han sido criticados recientemente por basarse en demasiados supuestos, a veces incorrectos (Kodandaramaiah 2011). Sería de una gran importancia, no sólo para el caso que nos ocupa sino para el estudio evolutivo de los Hormogástridos y de otras lombrices de tierra, encontrar metodologías alternativas más rigurosas.

### **Macroevolución**

Para determinar cuales son las presiones evolutivas que pueden explicar la diversidad del tiflosol multilamelar, es posible recopilar información morfológica y ecológica para los representantes de la familia Hormogastridae y estudiar la correlación de las distintas variables con el número de laminillas. Los métodos filogenéticos comparados permiten evaluar la correlación entre fenotipo y variables ambientales teniendo en cuenta la no independencia de las especies con historia evolutiva compartida (Felsenstein 1985). Esta metodología ha sido utilizada asiduamente para explicar la variabilidad morfológica en

un contexto evolutivo en vertebrados, pero raramente ha sido aplicada a invertebrados (Jervis *et al.* 2007; Gonçalves-Souza *et al.* 2014).

Además de la hipótesis inicial de la relación entre un número creciente de laminillas del tiflosol y el menor aporte de materia orgánica de los suelos (contradicha por el caso de *H. elisae*) se pueden formular otras teorías en las que basar la selección de variables para tal análisis, como una posible relación entre el incremento de tamaño corporal y el incremento en el número de laminillas del tiflosol (dos tendencias aparentemente paralelas) o la posible influencia de la textura del suelo, ya que las partículas ingeridas interaccionan físicamente con el tiflosol.

### **Macroecología**

El concepto de género está cargado de subjetividad, al no haberse definido criterios como los que sí existen a nivel de especie. Esto dificulta la tarea de delimitación y validación de esta categoría taxonómica. Lin *et al.* (2013) propusieron la monofilia, magnitud de divergencia interna e igualdad de rango entre clados hermanos como criterios para la validación de un género. Talavera *et al.* (2013) y Puillandre *et al.* (2015) se basaron en el uso de árboles ultramétricos y la antigüedad de los clados como referencia: un clado constituiría un género si su edad estimada es semejante a la de otros géneros. Aunque estos criterios parecen útiles, no aportan un auténtico significado biológico a la categoría de género. La caracterización ecológica ha sido ampliamente utilizada para delimitar y diferenciar especies hermanas (Hawlitschek *et al.* 2011, Santos *et al.* 2014), pero también ha sido aplicada a taxones de nivel superior como familias (Giribet *et al.* 2012). Parece razonable extender esta metodología a la delimitación de géneros: si las características ecológicas de un conjunto monofilético de especies difieren significativamente de las de otro, esto apoyaría su entidad como unidad evolutivamente significativa. Esta

caracterización ecológica requiere dos fases: la modelización del nicho ecológico y la comparación estadística de estos nichos. En el primer caso MaxEnt (Philips, Anderson y Schapire 2006) destaca entre los programas de modelización de nicho por su gran rendimiento basándose únicamente en datos de presencia (los más fiables en fauna del suelo). En el segundo caso ENMtools (Warren, Glor y Turelli 2010) permite la comparación de modelos de nicho ecológico, cuantificando su grado de solapamiento y determinando si son significativamente distintos.

Dado que la modelización mediante Maxent ha sido muy poco utilizada en lombrices de tierra, la aproximación ideal pasaría por optimizar la técnica con un grupo de especies con un amplio número de citas y del que se conozcan aspectos de sus preferencias ecológicas, como es el caso del complejo *H. elisae* (Novo *et al.* 2009, 2010, 2012b, Hernández *et al.* 2003, 2007).

### **Nuevos caracteres morfológicos**

En la búsqueda de caracteres morfológicos que pudieran tanto ayudar a resolver las relaciones filogenéticas de los grandes clados de Hormogastridae, como servir de carácter diagnóstico para ellos, o encontrar diferencias entre los linajes crípticos de *H. elisae* (permitiendo por tanto describirlos como especies), cabe plantearse la utilidad de las quetas, la única estructura esclerotizada del cuerpo en lombrices de tierra. Si bien la morfología de las quetas más abundantes (que utilizan para reptar y anclarse a las paredes de las galerías) es muy homogénea entre familias y géneros, existe otro tipo de quetas más especializadas y con una función aparentemente implicada en la reproducción. El tipo presente en hormogástridos, conocido como quetas genitales (ver Gates 1972 para una clasificación) ha sido menos estudiado que las quetas peneanas de otras familias (Megascolecidae, Acanthodrilidae, Kynotidae, Eudrilidae o Benhamiidae), donde se

utilizan a menudo en la descripción de especies (Lee 1959, Jamieson 1974, James and Divina, 2012; Sherlock and Csuzdi, 2013, Razafindrakoto et al., 2011).

No obstante, Kvavadze (1991, 1993, 1996, 1997) utilizó la sección triangular de las quetas genitales de algunos lumbrícidos para inferir relaciones filogenéticas supraespecíficas. Estos trabajos fueron seguidos por los de Rota y Erséus (1997), Csudzi y Pavlicek (2011), Szederjesi et al. (2013) o Szederjesi and Csudzi (2015). Rota (1993) realizó un estudio comparativo preliminar de las quetas genitales de algunos representantes de la familia Hormogastridae, que le llevó a sugerir el uso de esta estructura como carácter taxonómico putativo para la familia.

El uso de la microscopía electrónica de barrido (o SEM) en lugar de microscopía óptica tradicional y la inclusión de representantes de todos los clados encontrados en Hormogastridae, así como el estudio de representantes de los linajes crípticos de *H. elisae*, podrían proporcionar parte de la información filogenética que buscamos.

### **Taxonomía integrativa**

El conjunto de caracteres morfológicos presentes en hormogástridos espera ser reevaluado y estudiado sistemáticamente mediante su codificación e inclusión en análisis filogenéticos. Los análisis combinados de marcadores moleculares y datos morfológicos (conocidos como análisis de evidencia total o total evidence analyses) han sido usados de forma creciente en los últimos años. Aunque en el único antecedente de su implementación en lombrices de tierra (Domínguez *et al.* 2015) su uso no representó una mejora significativa, trabajos en otros grupos (Sánchez et al. 2016) han mostrado su capacidad de recuperar relaciones filogenéticas esquivas. Además, el uso de la reconstrucción de estados ancestrales de caracteres ha permitido comprender la evolución de los caracteres morfológicos proyectándola sobre la filogenia, y permitiendo diferenciar



los caracteres autapomórficos (derivados) de los homoplásicos (convergentes) o plesiomórficos (ancestrales).

Una herramienta puntera en el estudio morfológico de invertebrados, la microtomografía computarizada (o  $\mu$ CT) ha sido aplicada por primera vez a lombrices de tierra por Fernández *et al.* (2014) con prometedores resultados. Esta técnica no ha sido utilizada en estudios comparativos a nivel supraespecífico, y podría ser de gran utilidad para la detección, adquisición y confirmación de caracteres de utilidad sistemática. La familia Hormogastridae es sin duda una candidata excelente para evaluar la utilidad de este tipo de técnicas a niveles taxonómicos más generales.

Esta aproximación, seguida de su integración con el resto de fuentes de información disponibles (taxonomía integrativa), permitiría abordar la revisión sistemática de la familia Hormogastridae, proporcionando un nuevo sistema formalizado de géneros bien definidos.

## **I.5. Objetivos**

Los objetivos de esta tesis responden a las hipótesis planteadas en el apartado anterior.

### **Capítulo II**

- Muestreo del territorio comprendido entre las áreas de distribución del complejo *H. elisae* y el resto de hormogástridos del Noroeste de la Península Ibérica.
- Descripción de las especies encontradas.
- Determinación de sus relaciones filogenéticas.

### **Capítulo III:**

- Implementación de la modelización de nicho ecológico mediante Maxent a un clado de hormogástridos (*H. elisae*).
- Selección y optimización de las variables ambientales predictoras.
- Validación estadística de los resultados obtenidos

### **Capítulo IV:**

- Modelización del nicho ecológico de los principales clados de la familia Hormogastridae.
- Caracterización de los nichos ecológicos mediante la contribución diferencial de las variables.
- Estudio del solapamiento, amplitud y diferenciación estadística de los nichos ecológicos
- Comparación de los nichos potenciales y realizados.

### **Capítulo V:**

- Estudio de la correlación de algunas variables morfológicas y ambientales con el número de laminillas del tiflosol en Hormogastridae, teniendo en cuenta su historia evolutiva compartida.
- Evaluación de la señal filogenética de los caracteres morfológicos y variables ambientales estudiadas.
- Intepretación del *tempo* de la evolución del número de laminillas del tiflosol.

## **Capítulo VI:**

- Estudio de la variabilidad morfológica de las quetas genitales de representantes de los clados principales de Hormogastridae mediante SEM.
- Búsqueda de caracteres con señal filogenética en niveles taxonómicos supraespecíficos, que puedan esclarecer relaciones filogenéticas entre clados o caracterizar dichos clados.
- Estudio morfométrico para diferenciar los linajes crípticos del complejo *H. elisae*.

## **Capítulo VII:**

- Comprobación del aislamiento geográfico o solapamiento de los linajes crípticos de *H. elisae*.
- Evaluación de la existencia de flujo génico entre los linajes crípticos.
- Estudio de los patrones filogeográficos del complejo en el centro de la Península Ibérica.
- Aproximación al marco temporal de la diversificación del complejo *H. elisae*.

## **Capítulo VIII:**

- Reevaluación de los caracteres morfológicos disponibles en la familia Hormogastridae e inclusión en análisis filogenéticos de evidencia total.

-Establecimiento de un nuevo sistema de géneros basado en las relaciones filogenéticas inferidas.

-Elaboración de diagnósis morfológicas para los géneros, incluyendo fuentes de información adicionales.

Nota: Se ha optado por presentar los capítulos en el orden cronológico de publicación, ya que cada uno de ellos ha ido incorporando información de los anteriores para su elaboración e interpretación.

## Publicaciones incluidas en la tesis

1. **Marchán DF**, Fernández R, Novo M, Díaz Cosín DJ (2014). New light into the hormogastrid riddle: morphological and molecular description of *Hormogaster joseantonioi* sp. n. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae). *ZooKeys* 414: 1-17 **Capítulo II**

2. **Marchán DF**, Refoyo P, Novo M, Fernández R, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2015). Predicting soil micro-variables and the distribution of an endogeic earthworm species through a model based on large-scale variables. *Soil Biology and Biochemistry* 81: 124-127 **Capítulo III**

3. **Marchán DF**, Refoyo P, Fernández R, Novo M, de Sosa I, Díaz Cosín DJ. (2016). Macroecological inferences on soil fauna through comparative niche modeling: the case of Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta). *European Journal of Soil Biology* 75: 115-122 **Capítulo IV**

4. **Marchán DF**, Novo M, Fernández R, de Sosa I, Trigo D, Díaz Cosín DJ. (2016). Evolutionary pressures shape the typhlosole complexity in the digestive tract of hormogastrid earthworms (Annelida, Oligochaeta, Hormogastridae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 178 (1): 4-14 **Capítulo V**

5. **Marchán DF**, Sánchez N, Novo M, Fernández R, Pardos F, Díaz Cosín DJ (2016). Cryptic characters for cryptic taxa: on the taxonomic utility of the genital chaetae in earthworms (Oligochaeta, Hormogastridae). *Zoologischer Anzeiger* 264: 17-28 **Capítulo VI**

6. **Marchán DF**, Fernández R, de Sosa I, Díaz Cosín DJ, Novo M. (enviado). Pinpointing cryptic borders: Fine-scale phylogeography and genetic landscape analysis of the *Hormogaster elisae* complex (Oligochaeta, Hormogastridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **Capítulo VII**

7. **Marchán DF**, Novo M, Fernández R, de Sosa I, Sánchez N, Díaz Cosín DJ (In preparation). Integrative systematic revision of a Mediterranean earthworm family: Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta). **Capítulo VIII**

## Capítulo II- Nueva luz sobre el enigma hormogástrido: descripción morfológica y molecular de *Hormogaster joseantonioi* n. sp. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae)

### Resumen

La familia de lombrices de tierra Hormogastridae muestra una notable disyunción en su distribución en la Península Ibérica, con el complejo de especies *Hormogaster elisae* aislado del resto de especies. *Hormogaster joseantonioi* n. sp., una nueva especie encontrada en el área intermedia entre las áreas de distribución principales (en Teruel, Aragón) fue descrita siguiendo la aproximación integrativa, como es adecuado para lombrices de tierra debido a su morfología altamente homoplásica. El análisis filogenético basado en marcadores moleculares situó a la nueva especie como taxón hermano de *H. elisae*, mostrando así que el linaje colonizador del centro de la Península Ibérica podría haberse originado cerca del área de distribución actual de *Hormogaster joseantonioi* n. sp.. Los caracteres morfológicos externos mostraron cierto grado de solapamiento con especies descritas previamente, pero los caracteres internos presentados como intrusiones en los miembros de la familia. Estas características hacen de la nueva especie una pieza clave para comprender la evolución de Hormogastridae.

# New light into the hormogastrid riddle: morphological and molecular description of *Hormogaster joseantonioi* sp. n. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae)

Daniel Fernández Marchán<sup>1,†</sup>, Rosa Fernández<sup>2,‡</sup>,  
Marta Novo<sup>3,§</sup>, Darío J. Díaz Cosín<sup>1,|</sup>

**1** Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis 2, 28040, Madrid, Spain **2** Museum of Comparative Zoology, Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, 26 Oxford Street, Cambridge, MA 02138, USA **3** Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, BIOSI 1, Museum Avenue, Cardiff CF10 3AT, UK

† <http://zoobank.org/CAB83B57-ABD1-40D9-B16A-654281D71D58>

‡ <http://zoobank.org/99618966-BB50-4A01-8FA0-7B1CC31686B6>

§ <http://zoobank.org/79DA5419-91D5-4EAB-BC72-1E46F10C716A>

| <http://zoobank.org/38538B17-F127-4438-9DE2-F9D6C597D044>

Corresponding author: Daniel Fernández Marchán (danifermch@gmail.com)

---

Academic editor: R. Blakemore | Received 7 April 2014 | Accepted 26 May 2014 | Published 5 June 2014

---

<http://zoobank.org/8C6549A9-B40D-4447-8E37-62224B9EAA17>

---

**Citation:** Marchán DF, Fernández R, Novo M, Cosín DJD (2014) New light into the hormogastrid riddle: morphological and molecular description of *Hormogaster joseantonioi* sp. n. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae). ZooKeys 414: 1–17. doi: 10.3897/zookeys.414.7665

---

## Abstract

The earthworm family Hormogastridae shows a remarkable disjunction in its distribution in the Iberian Peninsula, with the *Hormogaster elisae* species complex isolated from the rest of the species. *Hormogaster joseantonioi* sp. n., a new species found in the intermediate area between the main ranges (in Teruel, Aragón), was described following the integrative approach, as it is suitable for earthworms due to their highly homoplastic morphology. The phylogenetic analysis of the molecular markers placed the new species as a sister taxon to *H. elisae*, thus showing the colonizing lineage of Central Iberian Peninsula could have originated near the *H. joseantonioi* sp. n. current range. External morphological characters revealed some degree of overlap with previously described species, but internal characters presented configurations/states unknown from other members of the family. These traits make the new species a key piece to understand the evolution of Hormogastridae.



## Keywords

Species description, earthworm, integrative taxonomy, phylogeny, disjunct distribution

## Introduction

The increasing availability of molecular and ecological data has placed the integrative taxonomy (as defined by Dayrat 2005) as a viable alternative to traditional species description. Several authors advocate its use in different animal groups (Padial and De La Riba 2010; Schlick-Steiner et al. 2010; Heethoff et al. 2011; but see Yeates et al. 2011 for iterative taxonomy instead) and particularly in earthworms (Blakemore and Kupriyanova 2010; Novo et al. 2012), whose taxonomy is in need of deep revision in the light of molecular phylogeny (Jamieson et al. 2002; Pop et al. 2003, 2007; Chang et al. 2008; Briones et al. 2009; Pérez-Losada et al. 2009, 2011; Novo et al. 2011; Fernández et al. 2012).

Fernández et al. (2014) have developed a new tool based in micro-computed tomography to study specimens in a non-destructive way which could help as an additional source of information.

Taxonomic characters traditionally used for the study of earthworms are few and sometimes present high intraspecific variability (Michaelsen 1900 and Stephenson 1930 on their global fauna; Pop et al. 2003 and Briones et al. 2009 about lumbricid earthworms). Recent findings show that cryptic diversity is common in these animals (but see critique in Blakemore et al. 2010), therefore earthworm taxonomy can particularly benefit from an integrative approach.

Novo et al. (2011) presented a molecular phylogeny of Hormogastridae (Oligochaeta, Annelida), whose taxonomy has historically been built on morphological characters, which highlighted some interesting evolutionary aspects. On one hand, hormogastrid distribution across the Western Mediterranean is biogeographically consistent, reflecting the geological events that affected the region in the Tertiary (which confirms previous studies, e.g Bouché 1972, Sbordoni et al. 1992). Two species -*Xana omodeoi* Díaz Cosin, Briones & Trigo, 1989 and the morphospecies *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 -, however, are found in locations far apart from the family main range in the Iberian Peninsula. While all the other Iberian species are distributed in Northeastern Spain, *X. omodeoi* inhabits Northwestern Spain and *H. elisae* is found in Central Spain (Segovia, Madrid and Guadalajara). The result is a disjunct distribution.

Novo (2010) found *Hormogaster elisae* complex to be monophyletic, and thus the likely result of a single colonisation event presumably from the North or the East of the Iberian Peninsula. There could be remaining populations of the migrating lineage in the geographic gap, which haven't been discovered yet.

On the other hand, it seems that most key characters used for hormogastrid traditional taxonomy and phylogeny (notably the shape, number and position of the spermathecae) are highly homoplastic, showing little or no phylogenetic signal across the family.

Due to its relevance for this subject, the intermediate area between the main ranges of hormogastrids in Spain has been subject to recent sampling campaigns. Both Zaragoza and Teruel (Aragón, Spain) were suitable regions as they have been poorly sampled for earthworms unlike the surrounding provinces. While no success was met in Zaragoza, a population assignable to a new species of Hormogastridae was recently found in Teruel.

This paper focuses on the description of *Hormogaster joseantonioi* sp. n. from an integrative point of view, following the example of Novo et al. (2012). The new molecular and morphological data are interpreted to gain insight into the diversification and morphological radiation of the family, with some considerations about its constituent genera.

## Materials and methods

### Earthworm specimens and sampling points

Specimens were collected by hand and fixed in the field in ca. 96% EtOH, with subsequent alcohol changes. Once in the laboratory, specimens were preserved at -20 °C.

The studied material includes 10 specimens (five mature specimens, one semimature specimen with tubercula pubertatis and four immatures) collected in a cleared holm-oak wood at the foothill of Sierra de Oriche, road A-2514 between Huesa del Común and Rudilla, Teruel (Spain) (41°0'55.68"N, 0°58'55.98"W) (Figure 1).



**Figure 1.** Map of the Iberian Peninsula showing the collection site of *H. joseantonioi* sp.n. (indicated by the white star). The northeastern hormogastrid range is shown in green, *H. elisae* range is shown in pink and *X. omodeoi* known location is indicated in yellow.

Specimens have been deposited in the Oligochaete collection of the Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad Complutense de Madrid (UCMLT), Spain with vouchers UCMLT 00001-00010.

Specimens available from previous studies (Novo et al. 2010, 2011, 2012) of all known hormogastrid species were used for comparison. Morphological characters include those features traditionally used for hormogastrids and other earthworms.

### Molecular data generation

Total genomic DNA was extracted from ventral integument tissue samples using the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) with two consecutive steps of elution (70 µl of buffer). Seven molecular regions were amplified: mitochondrial subunit 1 of cytochrome *c* oxidase (COI), 16S rRNA and tRNA Leu, Ala, and Ser (16S t-RNAs), one nuclear ribosomal gene (a fragment of 28S rRNA) and one nuclear protein-encoding gene (histone H3). Primer sequences, polymerase chain reactions (PCR) and sequencing reactions are the same as in Novo et al. (2011). GeneBank accession numbers for the holo- and paragenotypes, following Chakrabarty (2010) for the markers analysed here are shown in Table 1.

### Phylogenetic analyses

The new sequences were combined with all the hormogastrid information available from previous studies (Novo et al. 2010, 2011, 2012) in order to find their phylogenetic placement inside the family. *Pontodrilus litoralis* Grube, 1855, *Dichogaster saliens* Beddard, 1893, *Amyntas robustus* Perrier, 1872, *Lumbricus terrestris* Linnaeus, 1758 and *Aporrectodea trapezoides* Dugès, 1828 were used as outgroups (all the GenBank accession numbers are shown in Appendix). As hormogastrid individuals from

**Table 1.** Holo- and paragenotypes (sensu Chakrabarty, 2010) of *H. joseantonioi* sp. n., and their GenBank accession numbers. The hologenotype is shown in bold.

Specimen	Voucher	COI	16S-tRNAs	28S rRNA	H3
HRUD1	UCMLT 00001	KJ632674	KJ632684	KJ632686	KJ632688
HRUD2	UCMLT 00002	KJ632675	KJ632685	KJ632687	KJ632689
<b>HRUD3</b>	<b>UCMLT 00003</b>	<b>KJ632676</b>			
HRUD4	UCMLT 00004	KJ632677			
HRUD5	UCMLT 00005	KJ632678			
HRUD6	UCMLT 00006	KJ632679			
HRUD7	UCMLT 00007	KJ632680			
HRUD8	UCMLT 00008	KJ632681			
HRUD9	UCMLT 00009	KJ632682			
HRUD10	UCMLT 00010	KJ632683			

the same locality usually cluster together, one individual was analysed as representative per sampling site.

Sequences of each individual gene were aligned in MAFFT (Katoh and Standley 2013) with default settings and concatenated, resulting in a matrix of 2532 bp. jModelTest v. 2.1.3 (Darriba et al. 2012) was used to select the best-fit evolutionary model using the Akaike information criterion (AIC; Akaike 1973), and Bayesian information criterion (BIC; Schwarz 1978) which were GTR+I+G for COI, 16s and 28s, and HKY+I+G for H3.

Bayesian Inference (BI) of the phylogeny was estimated with MRBAYES v.3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) implemented in the CIPRES Science Gateway V. 3.3. (<http://www.phylo.org/index.php/portal/>). Unlinked nucleotide substitution models selected were specified for each gene fragment and the nucleotide substitution estimates were allowed to vary independently between each partition. Parameters were set to ten million generations and 10,000 trees were sampled for every 1000th generation, initiating the analysis from a random tree. After two analysis were performed 20% of the trees were discarded as burn-in, and the remaining trees were combined to find the maximum a posteriori probability estimate of phylogeny. Maximum likelihood analyses were performed with RAxML 7.2.7 (Stamatakis 2006) in the CIPRES Science Gateway with default settings, using GTR+I+G for each data partition and estimating the support for the resulting topologies by 100 bootstrap replicates.

Uncorrected pairwise differences for the mitochondrial regions were calculated between *H. joseantonioi* and the most closely related species with Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer 2010). To visualize the genetic distance we constructed networks with SplitsTree4 v.4.11.3 (Huson and Bryant 2006) for the more variable genes, including the former species plus *Hormogaster riojana* Qiu & Bouché, 1998 and *A. trapezoides* as outgroups. Default settings were used.

## Results

### Taxonomic results

**Phylum Annelida Lamarck, 1802**

**Subphylum Clitellata Michaelsen, 1919**

**Class Oligochaeta Grube, 1850**

**Superorder Megadrilacea Benham, 1890**

**Order Haplotaxida Michaelsen, 1900**

**Family Hormogastridae Michaelsen, 1900**

**Genus *Hormogaster* Rosa, 1887**

**Type-species.** *Hormogaster redii* Rosa, 1887.

***Hormogaster joseantonioi* Fernández Marchán, sp. n.**

<http://zoobank.org/1B7B13C0-FA56-466E-9FFE-AB985EB582BA>

[http://species-id.net/wiki/Hormogaster\\_joseantonioi](http://species-id.net/wiki/Hormogaster_joseantonioi)

**Material examined.** Holotype. Adult (UCMLT 00003), 41°0'55.68"N, 0°58'55.98"W, from a cleared holm-oak wood on the foothill of Oriche mountains, road A-2514 between Huesa del Común and Rudilla, Teruel (Spain), collectors D. Fernández Marchán and J.A. Fernández Fernández.

**Paratypes.** Nine individuals (UCMLT 00001, 00002, 00004–00010), with the same collection data of the holotype.

**Other material examined.** 16 hormogastrid species and several subspecies belonging to the UCMLT collection.

**Morphological description.** *External morphology* (Figure 2). \*Measures taken on the two only complete specimens, one being the holotype.

Length of mature specimens\*: 178–180 mm.

Maximum diameter (pre-clitellar, clitellar, post-clitellar) of mature specimens: 8–10, 9–11, 7–10 mm.

Number of segments\*: 305–369.

Weight (fixed specimens)\*: 7.05–11.57 g.

Colour: From light brown to dark chocolate brown varying between individuals, with orangeish-brown clitellum of a lighter shade on living specimens (Figure 2a). Beige with brown stripes or patches, mainly on the anterior end, with darker clitellum on fixed specimens (Figure 2b).

Prostomium prolobic, longitudinal striation on segments 1 and 2.

Closely paired chaetae; interchaetal ratio at segment 40, *aa*: 33, *ab*: 1.3, *bc*: 6, *cd*: 1, *dd*: 27. Nephridial pores in a row between chaetae *b* and *c* (very close to *b*), visible on fixed specimens as a brownish line.

Spermathecal pores at intersegments 9/10 and 10/11 at the level of *cd*.

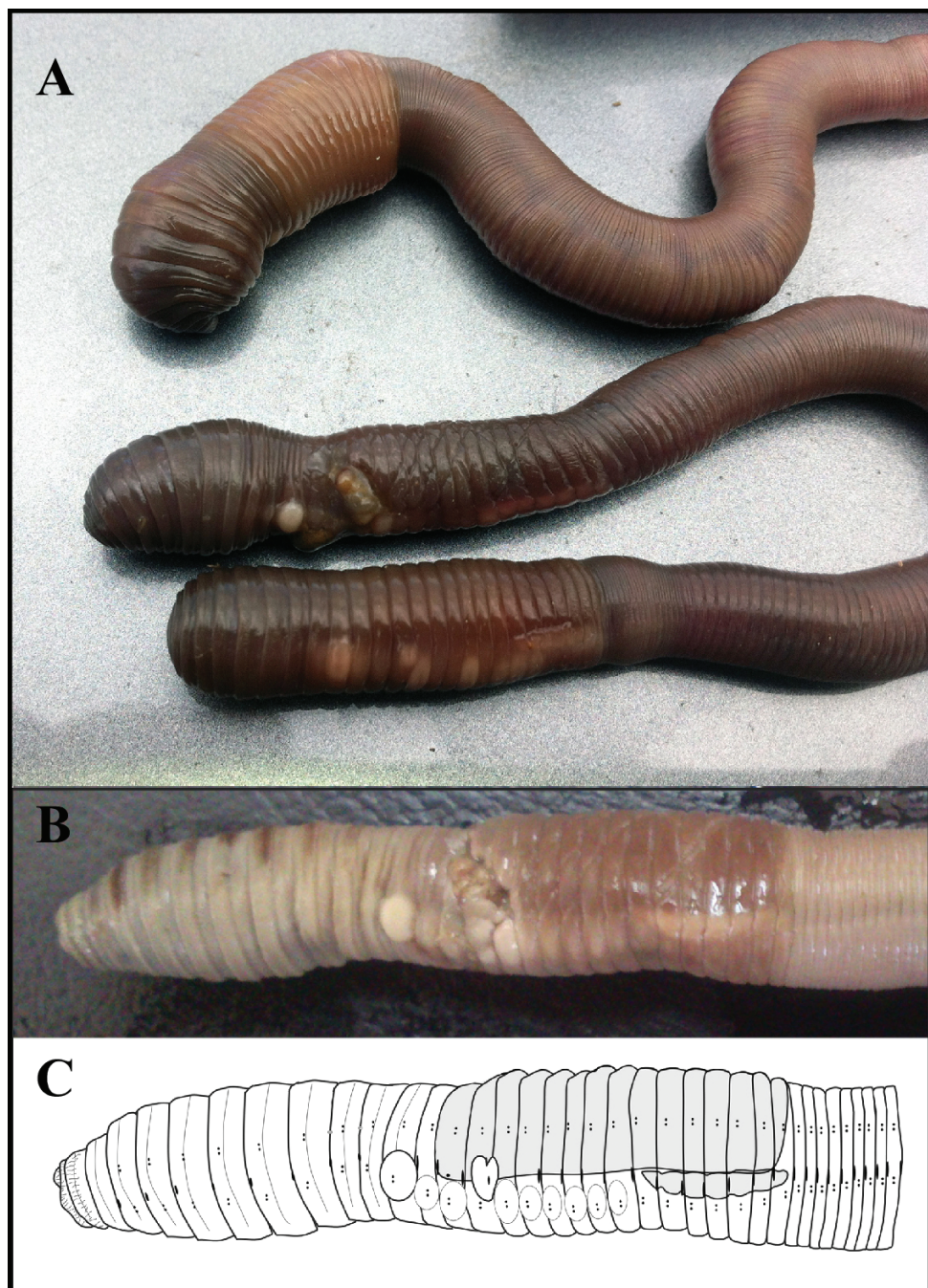
Male pores open over chaetae *ab* at the intersegment 15/16, surrounded by heart-shaped porophores which extend over most of segment 15 and at least half of 16. Female pores in segment 14 at the same level as male pores.

Clitellum saddle-shaped extending over segments (13) 14–28. Tubercula pubertatis on 1/n 22–27(1/n 28) as a continuous line. Papillae of chaetae *ab* in variable positions, usually between segments 12 and 28; papillae on 12 always showing an unusual degree of development in mature individuals, being very conspicuous both in live and fixed specimens (Figure 2a).

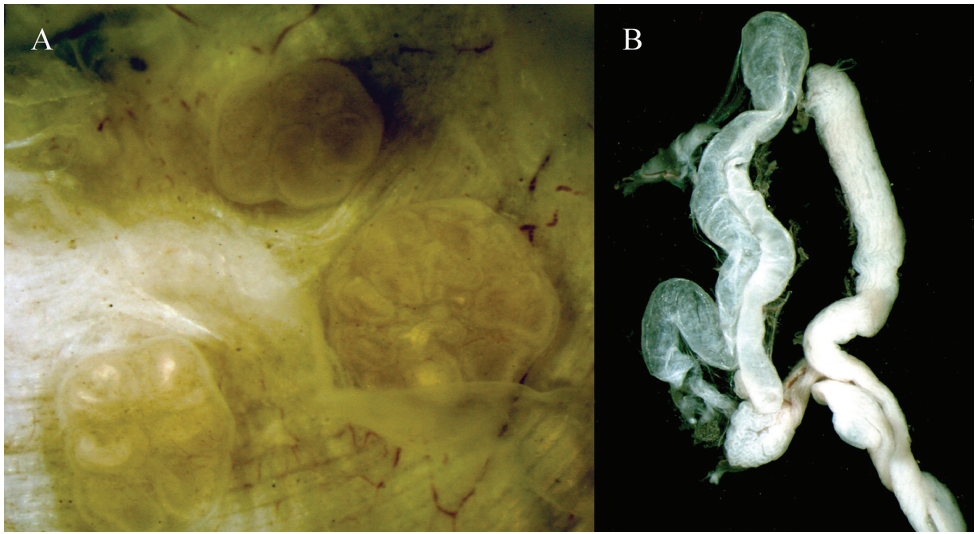
**Internal anatomy.** Funnel shaped, strongly thickened septa in 6/7, 7/8 and 8/9, septum 9/10 slightly thickened. The latter's attachment to the dorsal body wall is displaced two segments backwards, creating a mismatch between inner and outer segmentation with an internally very wide segment 9.

Last pair of hearts in segment 11. Three shiny, strongly muscular gizzards in 6, 7 and 8. Not apparent Morren's glands, even though small wrinkles exist in the oesophageal wall between segments 10 and 16.





**Figure 2.** (A) Live specimens of *H. joseantonioi* sp.n. External morphology of a fixed specimen, shown in a picture (B) and diagram (C).



**Figure 3. A)** Spermathecae in segments 9 and 10. Note the double spermathecae in segment 10 of this specimen. **B)** Nephridial bladder of segment 7.

A posterior gizzard is not well differentiated. There is a slight dilatation of the oesophagus between 14 and 16, but it lacks the muscular wall and reinforcements of a true gizzard. First section of the intestine is not dilated.

Typhlosole begins around segments 20 and 21 with seven lamellae, which around segments 26–27 increase to nine. From there they decrease gradually in number until segments 80–105, where they fuse in a single lamella. The latter extends until segments 218–230, where the typhlosole ends.

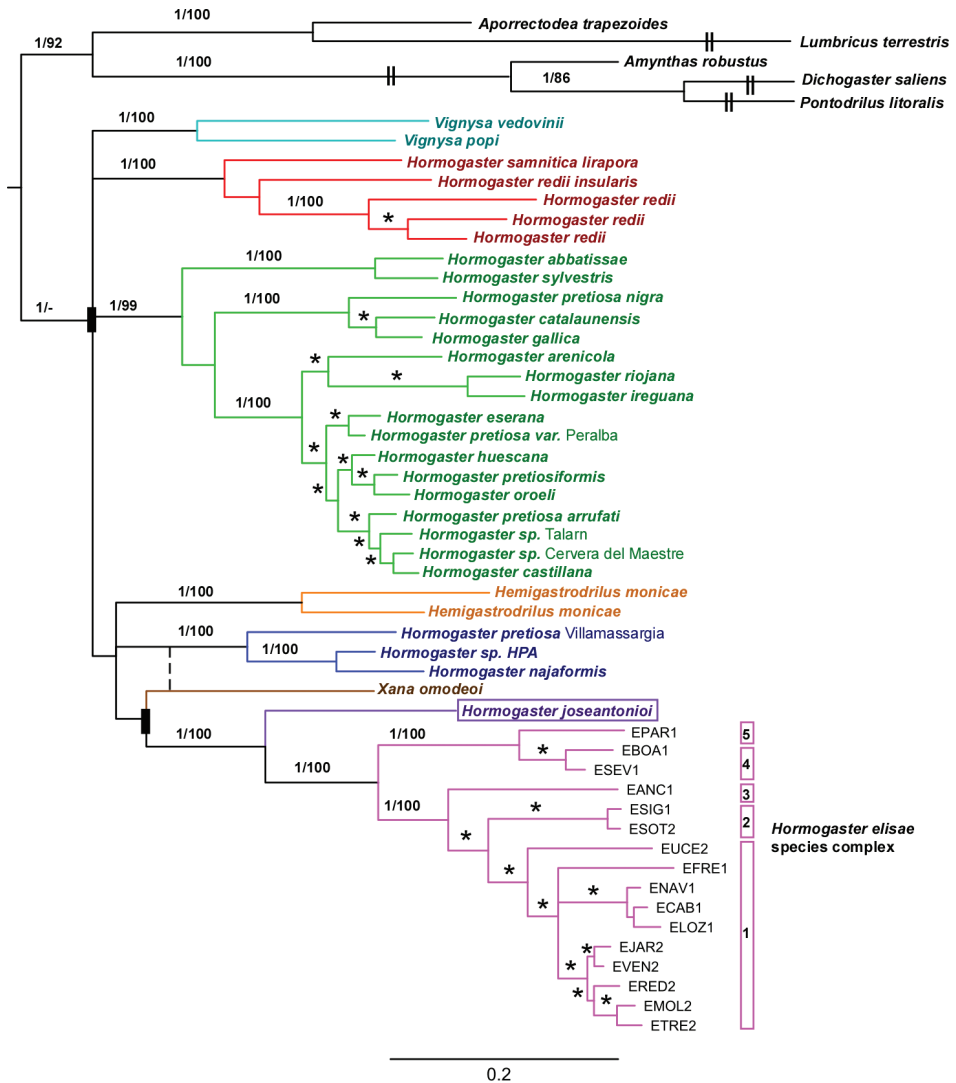
Fraying testes and iridescent seminal funnels in 10 and 11. Two pairs of voluminous, grainy seminal vesicles in 11 and 12. Ovaries and female funnels in 13, ovisacs in 14.

Two pairs of spermathecae in intersegments 9/10 and 10/11 (but apparently contained in segment 9 due to septum's backward displacement), the posterior pair bigger. They are sessile and disc-shaped, with multiple inner chambers which open to the exterior through a common pore, in the intersegments 9/10 and 10/11. Some individuals show double spermathecae (each multicameral and with own pore), either in 9/10 or 10/11 (Figure 3a).

Anterior nephridial bladders U-shaped with very close branches and no apparent cecum (Figure 3b). Bladders gradually flatten towards the end of the body, taking the usual elongated shape.

**Distribution.** Known only from its type locality.

**Habitat.** The specimens were collected at 10–20 cm deep in the soil in a cleared holm-oak wood, at the border between a dense forest of *Quercus rotundifolia* and a dryland farm. The soil had the following characteristics: 23.03% coarse sand, 8.06% fine sand, 5.33% coarse silt, 60.74% fine silt, and 2.84% clay, constituting a silty loam soil, carbon (C): 2.40%, nitrogen (N): 0.24%, C/N: 10.18, pH: 7.98. Mean annual



**Figure 4.** Bayesian inference of the phylogenetic tree on the concatenated sequence. Numbers above branches indicate posterior probability/bootstrap (of the Maximum Likelihood analysis) support values higher than 0.9/70 (shown as asterisks on terminal branches). Black rectangles show clades not recovered in both analyses (the alternative is shown with a dashed line). The cryptic species included in *H. elisae* are numbered from 1 to 5 (following Novo et al. 2010).

temperature is 12.7 °C and mean annual precipitation is 447.2 mm, as indicated by the nearest weather station (in Herrera de Los Navarros, Zaragoza-23 km away [http://www.aragon.es/DepartamentosOrganismosPublicos/Organismos/InstitutoAragon-esEstadistica/AreasTematicas/14\\_Medio\\_Ambiente\\_Y\\_Energia/ci.05\\_Clima\\_Datos\\_climatologicos.detalleDepartamento?channelSelected=ea9fa856c66de310VgnVCM2000002f551bacRCRD#section1](http://www.aragon.es/DepartamentosOrganismosPublicos/Organismos/InstitutoAragon-esEstadistica/AreasTematicas/14_Medio_Ambiente_Y_Energia/ci.05_Clima_Datos_climatologicos.detalleDepartamento?channelSelected=ea9fa856c66de310VgnVCM2000002f551bacRCRD#section1)).



**Etymology.** The species is named after Jose Antonio Fernández Fernández, father of the first author Daniel Fernández Marchán and important contributor during the sampling campaign in which this species was discovered.

**Molecular characters.** Analyses were conducted on sequences from loci COI (10 individuals), 16S (2 individuals), 28S (2 individuals) and H3 (2 individuals) of the new species, combined with similar sequences from other hormogastrid species.

The resulting Bayesian inference of the phylogenetic tree is shown in Figure 4. Its topology was congruent with that of the Maximum Likelihood inferred tree, except for the different placement of *X. omodeoi*. *H. joseantonioi* sp.n. was recovered as a monophyletic clade, with the *H. elisae* species complex as a sister clade.

Uncorrected pairwise distances for the genes COI and 16S-tRNA for *H. joseantonioi* and the species within the same clade (with *H. elisae* divided into its five cryptic species) are shown in Table 2.

## Discussion

Both morphological and molecular characters of *H. joseantonioi* sp.n. separate it clearly from all known hormogastrid species, the number of typhosole lamellae and the kind and location of the spermathecae being particularly distinctive. Those characters, while failing to resolve internal relationships within Hormogastridae, have been shown to be suitable for species diagnosis (Rota, 1993 on typhosole importance; Novo et al. 2012 on spermathecae number to separate *H. abbatissae* from *H. sylvestris*).

The species *H. riojana*, while distantly related according to molecular phylogeny, shows many similarities in morphology to *H. joseantonioi* (Table 3). However, *H. joseantonioi* differ by its lower number of lamellae in its typhosole and shorter tubercula pubertatis. Moreover it is longer and heavier. While the two species share a very similar position and shape of the spermathecae, some *H. joseantonioi* individuals show an additional spermatheca in segment 10 (on the right or left side). These cases don't seem to be teratologic, as the supernumerary spermathecae have their own pore in the body surface and contain sperm, thus being fully functional.

Other hormogastrid species possess double or multiple spermathecae, but never of the multicameral, disc shaped kind.

The geographically closest species, *H. castellana* (from Puerto Querol, Castellón), is neither morphologically nor phylogenetically closely related (Table 3).

*H. joseantonioi* sp. n. appears nested on a weakly supported clade on the phylogenetic tree, consisting in *Hemigastrodriulus monicae*, *Xana omodeoi*, *Hormogaster pretiosa* from Villamassargia, *Hormogaster najaformis* (and HPA from Omodeo, see Novo et al. 2011) and *Hormogaster elisae*. Genetic distances were high in all cases (16.47–19.08% for COI, 12.50–17.40% for 16S) according to the reference intervals given by Chang and James (2011). Aside from *H. elisae*, none of them showed significant morphological likeness to the new species, with the very different spermathecae configurations being noteworthy (Table 3).

**Table 2.** Uncorrected pairwise distances for the genes COI (below the diagonal) and 16S-rRNA (above the diagonal) for *H. joseantonioi* and the species on the same clade. XAN - *X. omodeoi*, HPRE - *H. pretiosa*, HNAJ - *H. najiformis*, HEM - two populations of *He. monicae*. Intraspecific divergence for COI/16S is shown in the diagonal.

	HJOS	HE3	HE1	HE2	HE5	HE4	XAN	HPRE	HNAJ	HEM*	HEM**
HJOS	0.14/0	13.10	14.20	12.50	19.41	13.50	14.23	14.28	15.31	17.40	16.07
HE3	18.10	0.29/0	9.87	9.96	17.18	12.34	14.37	15.93	16.69	17.54	15.57
HE1	17.77	15.51	10.03/4.10	7.97	17.83	12.95	15.54	17.73	17.54	17.26	16.56
HE2	16.47	14.16	15.13	1.75/0.67	17.03	13.38	14.93	16.62	18.18	16.70	16.70
HE5	16.83	16.28	17.48	16.36	0.34/0	16.37	21.04	21.55	22.37	22.28	21.32
HE4	19.08	15.67	17.37	16.86	10.38	3.75/1.75	15.49	18.06	17.51	17.81	16.53
XAN	18.30	18.26	18.36	18.96	17.01	18.49	0.37/0.19	11.60	13.58	14.34	12.66
HPRE	18.61	20.17	20.34	19.74	18.92	19.52	17.76	0/2.14	10.74	16.47	13.69
HNAJ	18.92	18.39	19.77	18.19	18.64	19.17	19.92	17.31	0.10/0.18	16.69	14.86
HEM*	18.38	18.52	19.17	20.45	17.06	18.58	20.45	19.67	19.92	3.50/1.97	8.76
HEM**	18.11	18.19	18.10	17.79	16.14	16.55	18.31	19.24	18.93	17.63	6.30/2.07

**Table 3.** Comparison of the morphological characters of *H. joseantonioi* sp. n. and some of the phylogenetically closest species (*H. elisae*, *X. omodeoi* and *H. najaformis* Qiu & Bouché, 1998) plus the distantly related *H. riojana* and *H. castillana* Qiu & Bouché, 1998. N. segments: number of segments. N. typhlosole lamellae: number of typhlosole lamellae. Body length, weight and number of segments refer to adult specimens.

	<i>H. joseantonioi</i>	<i>H. elisae</i>	<i>X. omodeoi</i>	<i>H. najaformis</i>	<i>H. riojana</i>	<i>H. castillana</i>
Colour	Brownish	Colourless	Colourless	Slightly greyish	Dark brownish	Brownish grey
Clitellum	(13)14–28	(13)14(15)–26(27)28	14–26	13–31	13,14,17–27,28	1/14,15–29,1/2 30
Tubercula pubertatis	1/n 22–27 (1/n 28)	22(23)–25(26)	23–26	20–26	(20)21–27	22–28
Length (mm)	178–180	92–200	20–161	188–230	154	200–325
N. segments	305–369	205–300	190–230	395–523	243–278	320–429
Weight (g)	7.05–11.57	1.96–9.67	0.59–4.23	22.6–31.4	6.57	12.85–29.38
Spermathecae position (pores) and appearance	9 (see text) (9/10,10/11) Simple(double) Multicameral, disc shaped	9,10 (9/10,10/11) Simple Tubular	10,11 (9/10,10/11) Simple Small, globular	10,11 (10/11,11/12) Multiple Small, globular	9,10 (9/10,10/11) Simple Multicameral, disc shaped	9,10 (9/10,10/11) Simple Globular
N. typhlosole lamellae	9	5	12	15–17	15	21–23
Thickened septa	6/7,7/8,8/9, (9/10)	6/7,7/8,8/9, (9/10)	(6/7),7/8,8/9, 9/10,(10/11)	6/7,7/8,8/9, (9/10)	7/8,8/9,9/10, (10/11)	7/8,8/9,9/10, (10/11)

The *H. elisae* morphospecies was recovered as sister clade to *H. joseantonioi* sp. n. with high support. From a morphological point of view, most of their external characters overlap, except for a slightly longer clitellum and tubercula pubertatis, bigger average size and stronger pigmentation in *H. joseantonioi* sp. n. However, internal characters are very different and these species match neither in the number of lamellae in the typhlosole (five versus nine) nor in the structure of the spermathecae, which are tubular in *H. elisae* and disc-shaped and multicameral in *H. joseantonioi*. It’s worth noting that *H. elisae* shares the backwardly displaced disposition of the 9/10 septum.

Based on their phylogenetic and morphological relatedness, an origin of *H. elisae* from a common ancestor with *H. joseantonioi* sp. n. seems likely. This scenario is sensible from a biogeographical point of view, as the locality of the new species is intermediate between the ranges of *H. elisae* and the northeastern main hormogastrid range. A connection of emerged lands would have been possible from the Cretaceous-Tertiary boundary onwards (Andeweg 2002).

While *H. joseantonioi* status as a good species and its phylogenetic relationships seem quite clear, generic assignment is a more problematic matter. Novo et al. (2011) recovered the genus *Hormogaster* as paraphyletic in their molecular phylogeny, pointing out the need for a deep taxonomical revision of the family Hormogastridae, currently in preparation (author’s work in progress).

Based on its distinctive morphology and geographic range, high genetic divergence and consistent recovery as a well-defined clade, Novo (2010) suggested the *H. elisae*

species complex should be established as an independent genus. Due to the close phylogenetic position and morphological similarity of *H. joseantonioi* to this clade it could be argued they both should be included in the same genus.

At this stage it is more conservative to assign *H. joseantonioi* to the genus *Hormogaster* until the revision of the family is completed, which will allow to establish (if possible) a well-founded genera system on Hormogastridae. This work narrows the discontinuity between the North-Eastern and Central ranges of the Spanish hormogastrids. At the same time it highlights the importance of an intensive sampling of the area between Teruel and the center of the Iberian Peninsula (mainly zones of Soria and Guadalajara) to hopefully find new species along the hypothetical colonization route.

## Acknowledgements

We are indebted to Jose Antonio Fernández Fernández for his help during the sampling campaign. Subject Editor Rob Blakemore and two anonymous reviewers helped to improve the manuscript. This research was funded by project CGL2010-16032 from the Spanish Government.

## References

- Akaike H (1973) information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Csaki F (Eds) Second International Symposium on Information Theory. Budapest (Hungary). Akademiai Kiado, 267–281.
- Andeweg B (2002) Cenozoic tectonic evolution of the Iberian Peninsula, causes and effects of changing stress fields. PhD Thesis, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam.
- Álvarez J (1977) El género *Hormogaster* en España. Publicaciones del Centro Pirenaico de Biología Experimental 9: 27–35.
- Blakemore RJ, Kupriyanova EK (2010) Unravelling some Kinki worms (Annelida:Oligochaeta:Megadrili:Moniligastridae) Part I. Opuscula Zoologica. 40: 3–18. [http://opuscula.elte.hu/PDF/Tomus41\\_1/1\\_Op%20-%20Blakemore\\_Drawida.pdf](http://opuscula.elte.hu/PDF/Tomus41_1/1_Op%20-%20Blakemore_Drawida.pdf)
- Blakemore RJ, Kupriyanova E, Grygier MJ (2010) Neotypification of *Drawida hattamimizu* Hatai, 1930 (Oligochaeta: Megadrili: Moniligastridae) and the first COI sequence from an earthworm type. ZooKeys 41: 1–29. doi: 10.3897/zookeys.41.374
- Bouché MB (1972) Lombriciens de France, Écologie et Systématique. INRA, Paris, 671.
- Briones MJI, Morán P, Posada D (2009) Are the sexual, somatic and genetic characters enough to solve nomenclatural problems in lumbricid taxonomy? Soil Biology & Biochemistry 41, 2257–2271. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.07.008
- Chakrabarty P (2010) Genotypes: a concept to help integrate molecular phylogenetics and taxonomy. Zootaxa 2632: 67–68.
- Chang CH, James S (2011) A critique of earthworms phylogenetics. Pedobiologia 54: S3–S9. doi: 10.1016/j.pedobi.2011.07.015

- Chang CH, Lin S, Chen J (2008) Molecular systematics and phylogeography of the gigantic earthworms of the *Metaphire formosae* species group (Clitellata, Megascolecidae) Molecular Phylogenetics and Evolution 49: 958–968. doi: 10.1016/j.ympev.2008.08.025
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. Biological Journal of the Linnean Society, 85(3): 407–415. doi: 10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x
- Díaz Cosín DJ, Briones MJL, Trigo D (1989) Descripción de una nueva especie de lombriz de tierra, *Xana omodeoi* (Hormogastridae, Oligochaeta) y sus implicaciones en la división de los Hormogastridae. Revue d'Écologie et Biologie du Sol 26: 225–231.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10: 564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fernández R, Almodóvar A, Novo M, Simancas B, Díaz Cosín DJ (2012) Adding complexity to the complex: New insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 64: 368–379. doi: 10.1016/j.ympev.2012.04.011
- Fernández R, Kvist S, Lenihan J, Giribet G, Ziegler A (2014) *Sine Systemate Chaos?* A Versatile Tool for Earthworm Taxonomy: Non-Destructive Imaging of Freshly Fixed and Museum Specimens Using Micro-Computed Tomography. PLoS ONE 9(5): e96617. doi: 10.1371/journal.pone.0096617
- Heethoff M, Laumann M, Weigmann G, Rasputnig G (2011) Integrative taxonomy: Combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic *Trhypochthonius tectorum* complex (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). Frontiers in Zoology 8: 2. doi: 10.1186/1742-9994-8-2
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, Molecular Biology and Evolution 23: 254–267. doi: 10.1093/molbev/msj030
- Jamieson BG, Tillier S, Tillier A, Justine JL, Ling E, James S, McDonald K, Hugall AF (2002) Phylogeny of the Megascolecidae and Crassicitellata (Annelida, Oligochaeta): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. Zosystema-Paris-, 24(4): 707–734.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30: 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- Michaelsen W (1900) *Oligochaeta* (Vol. 10). R. Friedländer und Sohn.
- Novo M (2010) Algunos aspectos de la Biología Evolutiva de la Familia Hormogastridae Michaelsen, 1900: Filogenia, Filogeografía y Selección Sexual. Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 340 pp.
- Novo M, Almodóvar A, Fernández R, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2010) Cryptic speciation of hormogastrid earthworms revealed by mitochondrial and nuclear data. Molecular Phylogenetics and Evolution. 56: 507–512. doi: 10.1016/j.ympev.2010.04.010
- Novo M, Almodóvar A, Fernández R, Giribet G, Díaz Cosín DJ (2011) Understanding the biogeography of a group of earthworms in the Mediterranean basin – The phylogenetic puzzle

- of Hormogastridae (Clitellata: Oligochaeta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 125–135. doi: 10.1016/j.ympev.2011.05.018
- Novo M, Fernández R, Fernández Marchán D, Gutiérrez M, Díaz Cosín DJ (2012) Compilation of morphological and molecular data, a necessity for taxonomy: The case of *Hormogaster abbatissae* sp. n. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae). *ZooKeys* 242: 1–16. doi: 10.3897/zookeys.242.3996
- Padial JM, De La Riba I (2010) A response to recent proposals for integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 747–756. doi: 10.1111/j.1095-8312.2010.01528.x
- Pérez-Losada M, Ricoy M, Marshall JC, Dominguez J (2009) Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 52: 293–302. doi: 10.1016/j.ympev.2009.04.003
- Pérez-Losada M, Breinholt JW, Porto PG, Aira M, Dominguez J (2011) An earthworm riddle: systematics and phylogeography of the Spanish lumbricid *Postandrilus*. *PLoS ONE* 6: e28153. doi: 10.1371/journal.pone.0028153
- Pop AA, Wink M, Pop VV (2003) Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy (Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedobiologia* 47: 428–433.
- Pop AA, Cech G, Wink M, Csuzdi C, Pop VV (2007) Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). *European Journal of Soil Biology* 43: S43–S52. doi: 10.1016/j.ejsobi.2007.08.007
- Qiu JP, Bouché MB (1998) Contribution to the taxonomy of Hormogastridae (Annelida: Oligochaeta) with description of new species from Spain. *Documents Pedozoologiques et Intérogologiques* 4: 164–177.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
- Rota E (1993) Contribution to the taxonomy of the Hormogastridae (Annelida: Oligochaeta) with description of two new species from southern France. *Journal of Natural History* 28: 27–36. doi: 10.1080/00222939400770031
- Sbordoni MC, De Matthaeis E, Alonzi A, Mattoccia M, Omodeo P, Rota E (1992) Speciation, genetic divergence and palaeogeography in the Hormogastridae. *Soil Biology and Biochemistry* 24(12): 1213–1221. doi: 10.1016/0038-0717(92)90096-G
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH (2010) Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology* 55: 421–38. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085432
- Schwarz GE (1978) Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6 (2): 461–464. doi: 10.1214/aos/1176344136
- Stamatakis A (2006) RAxML-V1-HP: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690. doi: 10.1093/bioinformatics/btl446
- Stephenson J (1930) *The Oligochaeta*. 978 pp.
- Yeates DK, Seago A, Nelson L, Cameron SL, Joseph L, Trueman JWH (2011) Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology* 36: 209–217.

## Appendix

**Supplementary material.** GenBank accession numbers for all sequences used in the phylogenetic analysis, including outgroups. RF: sequences provided by Rosa Fernández.

Species	COI	16S-tRNAs	28S-rRNA	H3
<i>H. castillana</i> QUE	HQ621989	HQ621883	HQ621960.1	HQ622028
<i>H. elisae</i> 3 ANC	EF653870	GQ409754.1	GQ409657.1	HQ622001
<i>H. elisae</i> 4 BOA	GQ409661.1	GQ409704.1	GQ409656.1	HQ622004
<i>H. elisae</i> 1 CAB	GQ409689.1	GQ409729.1	GQ409653.1	HQ622007
<i>H. elisae</i> 1 FRE	GQ409698.1	GQ409723.1	GQ409653.1	HQ622009
<i>H. elisae</i> 1 JAR	GQ409665.1	GQ409745.1	GQ409653.1	HQ622013
<i>H. elisae</i> 1 LOZ	EF653888	GQ409725.1	GQ409653.1	HQ622016
<i>H. elisae</i> 1 MOL	EF653875	GQ409732.1	GQ409653.1	HQ622019
<i>H. elisae</i> 1 NAV	GQ409683.1	GQ409730.1	GQ409653.1	HQ622021
<i>H. elisae</i> 5 PAR	EF653898	GQ409709.1	GQ409655.1	HQ622024
<i>H. elisae</i> 1 RED	EF653881	GQ409741.1	GQ409653.1	HQ622029
<i>H. elisae</i> 4 SEV	EF653905	GQ409707.1	GQ409656.1	HQ622031
<i>H. elisae</i> 2 SIG	EF653893	GQ409710.1	GQ409654.1	HQ622033
<i>H. elisae</i> 2 SOT	GQ409700.1	GQ409716.1	GQ409654.1	HQ622034
<i>H. elisae</i> 1 TRE	GQ409678.1	GQ409737.1	GQ409653.1	HQ622038
<i>H. elisae</i> 1 UCE	GQ409692.1	GQ409720.1	GQ409653.1	HQ622039
<i>H. elisae</i> 1 VEN	GQ409671.1	GQ409750.1	GQ409653.1	HQ622041
<i>H. pretiosa arrufati</i>	HQ621995	HQ621889	HQ621966.1	HQ622040
<i>H. pretiosa</i> var. PRB	HQ621987	HQ621881	HQ621958.1	HQ622026
<i>H. pretiosa</i> Villamassargia	HQ621998	HQ621893	HQ621969.1	HQ622045
<i>H. pretiosiformis oroeli</i>	HQ621984	HQ621877	HQ621955.1	HQ622022
<i>H. redii redii</i>	HQ621978	HQ621871	HQ621949.1	HQ622012
<i>H. redii redii</i>	HQ621971	HQ621863	HQ621942.1	HQ622000
<i>H. redii redii</i>	HQ621976	HQ621869	HQ621947.1	HQ622010
<i>H. redii insularis</i>	HQ621996	HQ621890	HQ621967.1	HQ622042
<i>H. samnitica lirapora</i>	HQ621993	HQ621887	HQ621964.1	HQ622036
<i>Hemigastrodriilus monicae</i>	HQ621979	HQ621872	HQ621950.1	HQ622014
<i>Hemigastrodriilus monicae</i>	HQ621982	HQ621875	HQ621953.1	HQ622018
<i>Hormogaster abbatisae</i>	HQ621990	HQ621884	HQ621961.1	HQ622030
<i>Hormogaster arenicola</i>	HQ621972	HQ621865	HQ621943.1	HQ622003
<i>Hormogaster catalaunensis</i>	HQ621973	HQ621866	HQ621944.1	HQ622005
<i>Hormogaster eserana</i>	HQ621977	HQ621870	HQ621948.1	HQ622011
<i>Hormogaster gallica</i>	HQ621974	HQ621867	HQ621945.1	HQ622006
<i>Hormogaster huescana</i>	HQ621980	HQ621873	HQ621951.1	HQ622015
<i>Hormogaster ireguana</i>	HQ621994	HQ621888	HQ621965.1	HQ622037
<i>Hormogaster najaformis</i>	HQ621985	HQ621878	HQ621956.1	HQ622023
<i>Hormogaster nigra</i>	HQ621988	HQ621882	HQ621959.1	HQ622027
<i>Hormogaster pretiosiformis</i>	HQ621983	HQ621876	HQ621954.1	HQ622020
<i>Hormogaster riojana</i>	HQ621970	HQ621862	HQ621941.1	HQ621999
<i>Hormogaster</i> sp. CER	HQ621975	HQ621868	HQ621946.1	HQ622008
<i>Hormogaster</i> sp. HPA	-	HQ621892	-	HQ622044
<i>Hormogaster</i> sp. TAL	HQ621992	HQ621886	HQ621963.1	HQ622035



Species	COI	16S-tRNAs	28S-rRNA	H3
<i>Hormogaster sylvestris</i>	HQ621981	HQ621874	HQ621952.1	HQ622017
<i>Vignysa popi</i>	HQ621991	HQ621885	HQ621962.1	HQ622032
<i>Vignysa vedovinii</i>	HQ621986	HQ621880	HQ621957.1	HQ622025
<i>Xana omodeoi</i>	HQ621997	HQ621891	HQ621968.1	HQ622043
<i>Amynthas robustus</i>	EF077569.1	EF490524.1	EF490529.1	-
<i>Dichogasters aliens</i>	-	AF406573.1	AY101560.1	-
<i>Pontodrilus litoralis</i>	-	AY340473.1	-	-
<i>Lumbricus terrestris</i>	HQ691222	U24570	HQ691218	HQ691227
<i>Aporrectodea trapezoides</i>	RF	HQ621864	RF	HQ622002



# **Capítulo III- Prediciendo micro-variables del suelo y la distribución de una especie de lombriz de tierra endogea a través de un modelo basado en variables a gran escala**

## **Resumen**

Los estudios sobre los patrones espaciales de distribución de la fauna del suelo han dependido habitualmente de las micro-variables del suelo o de análisis estadísticos basados en presencias/ausencias. Los Sistemas de Información Geográfica (SIG) permiten un fácil acceso a variables a gran escala para construir modelos de distribución de especies. En este estudio, se utilizó MaxEnt para modelizar la distribución de la lombriz de tierra endogea *Hormogaster elisae*. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de idoneidad predichos para localidades donde la especie estaba presente y para aquellas donde estaba ausente, validando el modelo predictivo. La mayoría de las variables predictoras a gran escala mostraron correlación significativa con micro-variables del suelo conocidas por influir en la biología de la especie, demostrando la capacidad del modelo para predecir (hasta cierto punto) variables del suelo a partir de variables ambientales. La metodología podría aplicarse a otros animales edáficos.



## Short communication

## Predicting soil micro-variables and the distribution of an endogeic earthworm species through a model based on large-scale variables



Daniel F. Marchán <sup>a,\*</sup>, Pablo Refoyo <sup>a,1</sup>, Marta Novo <sup>b</sup>, Rosa Fernández <sup>c</sup>, Dolores Trigo <sup>a</sup>, Darío J. Díaz Cosín <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/José Antonio Nováis 2, 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, BIOSI 1, Museum Avenue, Cardiff CF10 3AT, UK

<sup>c</sup> Museum of Comparative Zoology, Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, 26 Oxford Street, Cambridge, MA 02138, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 July 2014

Received in revised form

15 October 2014

Accepted 26 October 2014

Available online 23 November 2014

## Keywords:

Species distribution model

MaxEnt

*Hormogaster elisae*

Hormogastridae

## ABSTRACT

Studies on spatial patterns of distributions of soil dwelling animals have usually relied on soil micro-variables or statistical analyses based on presence/absence data. Geographic Information Systems (GIS) allow easy access to large-scale variables to build species distribution models. In this study, we used MaxEnt to model the distribution of the endogeic earthworm *Hormogaster elisae*. Significant differences were found between the predicted suitability values of localities where the species was present and those where it was absent, validating the predictive model. Most of the large-scale training variables showed significant correlation with soil micro-variables known to influence the biology of the species, proving the ability of the model to predict (to an extent) soil variables from environmental ones. The methodology could be extended to other soil fauna.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Soil invertebrate fauna has traditionally been neglected by diversity and ecological research (Decaëns, 2010) due to the difficulty of sampling their populations (Smith et al., 2008). With the increasing recognition of their importance, more studies have started to explore the spatial patterns of their diversity and species distribution (Chefaoui et al., 2005; Guil et al., 2009; Crawford and Hoagland, 2010).

Concerning earthworms, both soil micro-variables and large-scale variables such as land use, lithology and climate have shown a significant effect on their distributions (Palm et al., 2013). However, most studies have relied exclusively on soil micro-variables at small scale (e.g. Joschko et al., 2006; Ouellet et al., 2008) despite requiring an intense effort to get regional coverages and being difficult to extrapolate. In contrast, large-scale variables are nowadays widely available through Geographic Information Systems (GIS), therefore facilitating the inference of species distribution models based on them (as in Shartell et al.,

2013). It must be noted that the separation between both types of variables is not absolute, as some micro-variables show large-scale patterns and *vice versa*.

Other works used statistical analyses including absence data (Lindahl et al., 2009; Palm et al., 2013; Shartell et al., 2013), which are unreliable for soil fauna due to their difficult sampling. MaxEnt (Phillips et al., 2006) is an interesting statistical approach, as it is exclusively based on presence data and shows high predictive power when working with small datasets (Phillips and Dudík, 2008). It estimates the suitability of a location for the presence of a species as a function of the ecological similarity to its previously known habitat based on a set of environmental variables. MaxEnt has already been successfully implemented in soil dwelling arthropods (Crawford and Hoagland, 2010; Marek et al., 2012).

## 2. Model development

Hormogastrid earthworms (Oligochaeta, Hormogastridae) are especially difficult to sample due to their restricted distribution (Novo et al., 2012) and endogeic lifestyle. Obtaining distribution models that facilitate the selection of suitable sampling sites could help increasing knowledge of their currently poorly-known diversity and distribution. In this study, we chose the morphospecies *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 as a model system for the

\* Corresponding author.

E-mail address: [danifermch@gmail.com](mailto:danifermch@gmail.com) (D.F. Marchán).

<sup>1</sup> These authors contributed equally.

## **Supplementary Material 1.**

### **Materials and methods**

#### **Locations and sampling**

Seventeen locations from Central Spain, where *H. elisae* populations were previously found by Novo *et al.* (2010), were selected as input for the MaxEnt analysis (Phillips *et al.* 2006) (Suppl. Material 2). Twenty five additional presence locations plus fifty one where *H. elisae* was absent were selected for the statistical validation (Suppl. Material 2). Sampling was standardized to a minimum effort of 1 hour, digging in at least ten 2 m<sup>2</sup> spots in each 500m<sup>2</sup> plot.

#### **Species distribution modeling**

The following parameters of the model as implemented in MaxEnt were considered by default: a maximum number of 500 iterations, a convergence-threshold limit of 0.00001, 10,000 points as number maximum of background points and regularization multiplier equal to 1, as recommended by Phillips *et al.* (2006). Background points were randomly selected from the province of Madrid and all the surrounding provinces in central Iberian Peninsula (Segovia, Soria, Guadalajara, Cuenca, Toledo and Ávila).

Each time, a 30% of the sample records were randomly removed without replacement (through the subsample option) to be used as test points in order to measure the quality of the model, and the 70% of records were used to build the model (e.g. Tellería *et al.* 2012). The final model was constructed with the average of the replicates.

In the case of MaxEnt, the ROC-AUC technique has been used to analyze the goodness of fit of the analysis in contrast to other models of evaluation, since it avoids the problem of selecting threshold values (Lehmann *et al.*, 2002) and it is capable of measuring the

model ability to discriminate between the sites of species presence from the areas of absence (Fielding & Bell 1997; Engler *et al.* 2004; Elith *et al.* 2006; Phillips *et al.* 2006; Elith *et al.* 2010).

The large-scale variables potentially relevant for the biology of *H. elisae* were chosen as predictor variables to model its distribution, as described below.

Five bioclimatic variables were selected from Worldclim ( <http://www.worldclim.org/> ). Mean Diurnal Range (BIO2) – TRANGE and Isothermality (BIO 3) – ISOTHER; are suitable to represent the influence of extreme temperature variation (both daily and across the year) on earthworm biology. Precipitation of Driest Month (BIO 14) – PRDRY and Precipitation of Coldest Quarter (BIO 19) – PRCOLD; are likely to reflect the availability of water in the soil across the year, a essential requirement for earthworms. Lithology (Lithostratigraphic map of Spain, 1/200,000 scale, IGME) -LITHO was selected as topological variable, as it is likely to indirectly influence *H. elisae* ecology by determining the structure and biochemical characteristics of soils.

CORINE 2006 land cover (version 12/2009: <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/corine-land-cover-2006-clc2006-100-m-version-12-2009> )-VEGET was chosen to incorporate information about vegetation and land use, while the ‘Human footprint’ data set (representing the human influence on land surface; Sanderson *et al.* 2002)-ANTHRO was selected to include the expected effect of anthropic activities on habitat suitability.

After testing for colinearity no significant correlation above 0.8 was found between the predictor variables.

## Soil analysis

Soil factors regarded as most important for earthworm distribution (Edwards & Bohlen 1996; Hernández *et al.* 2003, 2007) were analyzed in 40 presence localities. When earthworms were found in different subsamples in the same locality, the soil samples were mixed. Soil texture (percentage of coarse/fine/total sand, coarse/fine/total silt, clay) and pH were measured as described by Guitián & Carballas (1976). Anne's (1945) method, adapted for a microplate reader (Microplate Bio-Rad, 590 nm) was used for organic oxidable carbon analysis using glucose as a standard, and expressed as a percentage. The Kjeldahl method was used to measure total nitrogen content as indicated in Page *et al.* (1982) and expressed as a percentage. The values are shown in Suppl. Material 2.

## Statistical validation and correlation

Both ANOVA and correlation analysis were performed using STATISTICA 7 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

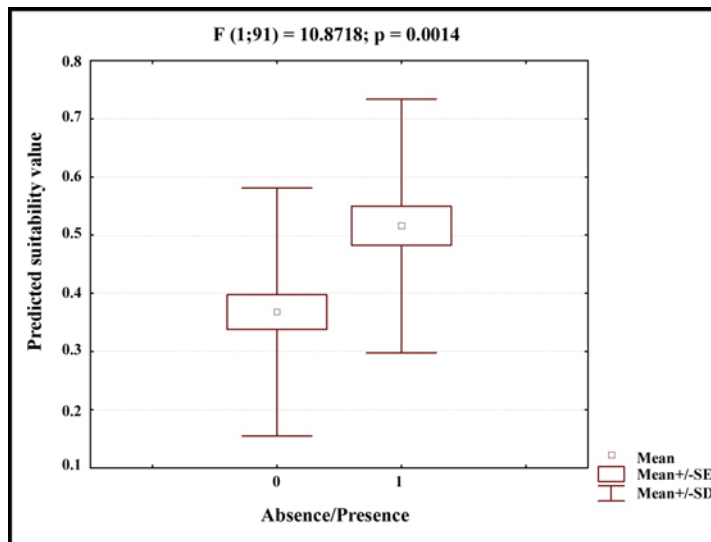
## Results

### Species distribution modeling

Variable	Percent contribution	Permutation importance	Range
TRANGE	58,4	72,4	100-104
ISOTHER	18,7	1,9	34-35.7
LITHO	12,7	8	*
VEGET	3,3	4,3	-
ANTHRO	3,6	1,2	-
PRCOLD	2,1	3,1	-
PRDRY	1,3	9,2	-
AUC+/- SD	0.892 +/- 0.05		

**Table 1.** Relative contribution of each variable to the prediction model. Large variation between percent contribution and permutation importance shows the high influence of a variable on the model, as it is the case for TRANGE, ISOTHER and LITHO. The significant range for the main contributing variables is also shown. \* 1-Metamorphized acid rocs, 2-Sandstones, 3-Quartzitic conglomerates, 4- Reddish arkosic lutites, 5- Arkoses, 6-Arkoses with cobble.

## Statistical validation



**Figure 2.** Box plot graphic of the predicted suitability values of absence (0) and presence (1) locations.

## References

- Anne P (1945). Sur le dosage rapide du carbone organique des sols. *Annales Agronomiques* 2, 162–172.
- Elith J, Graham CH, Anderson RP *et al.* (2006). Novel methods improve prediction of species distributions from occurrence data. *Ecography* 29, 129–151.
- Elith J, Phillips SJ, Hastie T, Dudík M, Chee YE, Yates CJ (2010). A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* 17, 43–57.
- Engler R, Guisan A, Rechsteiner L (2004). An improved approach for predicting the distribution of rare and endangered species from occurrence and pseudo-absence data. *Journal of Applied Ecology* 41, 263 – 274
- Fielding AH, Bell JF (1997). A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental Conservation* 24, 38-49.

- Gutián F, Carballas T (1976). Técnicas de análisis de suelos, 2nd edition. Editorial Pico Sacro, Santiago de Compostela.
- Hernandez P, Gutierrez M, Ramajo M, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2003). Horizontal distribution of an earthworm community at El Molar, Madrid (Spain). *Pedobiologia* 47, 568–573.
- Hernández, P, Fernández, R, Novo M, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2007). Geostatistical and multivariate analysis of the horizontal distribution of an earthworm community in El Molar (Madrid, Spain). *Pedobiologia* 51 13-21
- Lehmann A, Overton JM, Leathwick JR (2002). GRASP: generalized regression analysis and spatial prediction. *Ecological Modelling* 157, 189–207.
- Novo M, Almodóvar A, Fernández R., Trigo D, Díaz Cosín DJ (2010). Cryptic speciation of hormogastrid earthworms revealed by mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56(1), 507-512.
- Page AL, Miller RH, Keeney DR (1982). *Methods in Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. Agronomy 9, ASA-SSSA, Madison, Wisconsin, USA.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190, 231–259.
- Sanderson EW, Jaiteh M, Levy MA, Redford KH, Wannebo AV, Woolmer G (2002). The Human Footprint and the Last of the Wild: The human footprint is a global map of human influence on the land surface, which suggests that human beings are stewards of nature, whether we like it or not. *BioScience*, 52(10), 891-904.
- Tellería JL, Santos T, Refoyo P, Muñoz J (2012). Use of ring recoveries to predict habitat suitability in small passerines. *Distribution and Diversity* 18 (11), 1130-1138

Locality	Long.	Lat.	% Coarse sand	% fine sand	% total sand	% coarse silt	% fine silt	% total silt	% clay	% C	% N	C/N	pH
Anchuelo	-3,2425	40,4806	11,69	17,48	29,16	14,58	36,49	51,08	19,76	1,78	0,39	4,55	7,90
Boadilla del Monte	-3,9250	40,4306	59,67	11,93	71,60	2,32	7,61	9,93	18,47	1,18	0,24	4,98	6,42
Cubillo de Uceda	-3,4219	40,8272	22,94	16,53	39,47	26,20	20,14	46,34	14,19	2,30	0,48	4,83	5,57
El Molar	-3,5647	40,7394	52,47	19,91	72,38	2,92	9,61	12,53	15,10	0,96	0,16	5,92	6,40
El Pardo	-3,7950	40,5197	65,51	8,65	74,16	3,16	7,49	10,65	15,19	1,50	0,26	5,69	6,19
Fresno del Torote	-3,4117	40,5975	45,34	18,24	63,58	12,41	12,28	24,69	11,74	0,86	0,18	4,79	7,45
La Cabrera	-3,6217	40,8569	65,46	9,28	74,75	4,30	11,62	15,92	9,34	2,15	0,51	4,18	5,68
Lozoyuela	-3,6211	40,9475	50,37	20,21	70,58	10,23	10,76	21,00	8,43	2,00	0,42	4,72	5,49
Navas de Buítrago	-3,5939	40,9392	51,76	18,22	69,97	10,10	10,50	20,60	9,42	1,88	0,45	4,16	5,35
Paracuellos del Jarama	-3,5331	40,5100	36,01	11,48	47,49	12,36	13,69	26,06	26,45	1,82	0,34	5,31	7,00
Redueña	-3,6017	40,8128	38,15	21,36	59,51	8,63	19,83	28,46	12,03	1,77	0,40	4,45	7,62
Saldaña de Ayllón	-3,4283	41,3864											
Sevilla la Nueva	-4,0133	40,3447	66,19	8,22	74,41	2,93	6,58	9,52	16,08	1,28	0,20	6,46	5,93
Siguero	-3,6186	41,1850	44,99	10,90	55,89	10,74	18,13	28,88	15,23	2,14	0,61	3,54	5,05
Soto del Real	-3,7783	40,7750	45,11	25,74	70,84	6,50	13,97	20,46	8,69	1,87	0,33	5,74	5,43
Tres Cantos	-3,6781	40,6128	56,29	13,16	69,45	6,08	10,97	17,05	13,50	1,86	0,41	4,55	6,24
Venturada	-3,6219	40,8019	40,69	16,85	57,54	7,95	18,07	26,03	16,44	2,08	0,54	3,83	7,41
Barcones	-2,8683	41,2983	12,34	9,21	21,55	7,85	34,55	42,40	36,05	3,59	0,34	10,58	7,93
Cabañas de Polendos	-4,1000	41,0522	48,67	17,21	65,88	5,73	14,14	19,87	14,25	0,98	0,09	11,15	7,92
Cantoblanco	-3,6844	40,5422	40,64	23,07	63,71	7,96	10,89	18,85	17,44	0,67	0,07	9,68	5,18
Congostrina	-2,9928	41,0250	20,16	16,75	36,91	12,18	29,46	41,64	21,45	2,25	0,16	14,04	8,13
El Chaparral	-3,6492	40,8222	43,72	24,10	67,82	8,19	12,94	21,12	11,06	1,69	0,17	9,98	6,24
El Cuadrón	-3,6447	40,9444	43,99	26,54	70,53	4,10	13,30	17,39	12,07	3,64	0,19	19,04	5,57
El Verdugal	-3,6947	40,9481	48,99	20,73	69,72	5,02	12,96	17,98	12,30	1,46	0,11	13,24	7,12
Guadalix	-3,7081	40,7903	56,07	15,32	71,39	4,60	12,33	16,93	11,68	1,37	0,12	11,16	5,58
Hontoria	-4,1331	40,8928	58,37	21,95	80,32	4,70	8,45	13,15	6,53	0,44	0,04	10,15	6,46
Las Colinas	-3,4367	40,7097	33,34	23,38	56,72	11,71	14,00	25,71	17,57	1,38	0,13	10,44	6,45
Lozoya	-3,7631	40,9492	50,73	24,16	74,90	4,33	10,28	14,61	10,49	0,81	0,08	10,45	5,98
Miraflores	-3,7461	40,7931	44,19	19,83	64,02	5,30	18,02	23,32	12,67	1,44	0,22	6,50	5,73
Monte Holiday	-3,7303	40,9492	50,68	18,23	68,91	5,03	13,43	18,46	12,63	2,44	0,21	11,52	5,14
Pardo 1	-3,7622	40,5189	59,07	16,02	75,09	3,73	6,72	10,45	14,46	1,62	0,11	14,25	6,69
Pardo 2	-3,7514	40,5175	63,48	14,26	77,74	3,16	9,91	13,08	9,18	2,30	0,19	12,39	7,26
Pardo 3	-3,7347	40,5194	62,10	18,22	80,33	2,90	4,22	7,13	12,55	0,55	0,06	10,04	7,72
Pardo 4	-3,7111	40,5331	59,16	14,20	73,36	4,54	10,34	14,88	11,76	1,14	0,11	9,93	8,18
Pedraza	-3,8128	41,1008	52,46	26,97	79,43	5,39	8,72	14,11	6,46	0,94	0,07	12,57	5,88
Piscis	-3,6906	40,8017	60,51	16,95	77,46	4,23	9,03	13,25	9,28	1,05	0,10	10,14	6,57
Punto 2	-3,7028	40,7953	34,16	17,87	52,02	10,94	15,81	26,75	21,23	1,43	0,16	8,96	7,69
Punto 3	-3,6997	40,7972	38,19	14,07	52,25	14,33	22,26	36,58	11,16	0,65	0,07	8,92	6,30
Tamajón	-3,2531	40,9661	13,66	14,46	28,12	14,54	35,60	50,14	21,74	2,33	0,24	9,55	8,07
Tapia El Pardo	-3,7714	40,6000											
Valderromán	-3,1192	41,3644	8,36	5,71	14,08	10,32	52,87	63,19	22,74	4,06	0,33	12,44	7,98
Valdesaz	-3,7622	41,2364	21,72	24,99	46,70	12,06	36,70	48,77	4,53	1,18	0,12	10,17	7,83
NEG1	-3,3036	40,5138											
NEG2	-3,2308	40,5726											
NEG3	-3,2369	40,6494											
NEG4	-3,2376	40,6894											
NEG5	-3,3404	40,7984											
NEG6	-2,8265	41,0986											
NEG7	-2,7843	41,1750											



NEG8	-3,7535	40,9474												
NEG9	-3,7720	40,9477												
NEG10	-3,7147	40,9450												
NEG11	-3,7135	40,9429												
NEG12	-3,7119	40,9443												
NEG13	-3,7091	40,9423												
NEG14	-3,6952	40,7976												
NEG15	-3,6923	40,8000												
NEG16	-3,7083	40,7928												
NEG17	-4,0169	40,7053												
NEG18	-3,9876	40,7235												
NEG19	-3,8882	40,7748												
NEG20	-3,7287	40,5133												
NEG21	-3,7624	40,5149												
NEG22	-4,0256	40,5633												
NEG23	-4,0978	40,5312												
NEG24	-4,0244	40,5803												
NEG25	-4,0190	40,5454												
NEG26	-4,0174	40,5460												
NEG27	-3,6843	40,9437												
NEG28	-3,8659	41,2254												
NEG29	-3,9459	41,2128												
NEG30	-4,1963	40,7584												
NEG31	-3,5822	40,2630												
NEG32	-3,5994	40,0718												
NEG33	-3,6129	40,0174												
NEG34	-3,5789	40,2484												
NEG35	-3,8281	40,6805												
NEG36	-3,8947	40,6873												
NEG37	-3,9788	40,6623												
NEG38	-3,9088	40,6012												
NEG39	-3,7794	40,7132												
NEG40	-3,9554	40,5399												
NEG41	-3,8623	40,8958												
NEG42	-4,1062	40,5095												
NEG43	-4,1002	40,5116												
NEG44	-3,8681	40,9096												
NEG45	-3,8827	40,8708												
NEG46	-3,8587	40,8910												
NEG47	-3,8922	40,8457												
NEG48	-3,8844	40,8616												
NEG49	-3,8820	40,8894												
NEG50	-3,9245	40,8328												
NEG51	-3,9443	40,8293												

**Table S1.** Geographical coordinates of the localities included in this work, and main soil characteristics.  
% C: percentage of organic matter; % N: percentage of nitrogen; C/N: ratio of organic matter and nitrogen.

## **Capítulo IV- Inferencias macroecológicas en fauna del suelo a través de modelización comparada de nicho: el caso de Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta)**

### **Resumen**

La modelización de nicho ecológico (Ecological Niche Modeling, ENM) a través de MaxEnt y técnicas comparativas cuantitativas usando ENMtools podría facilitar las inferencias ecológicas en taxones problemáticos de la fauna del suelo. A pesar de su relevancia ecológica en la Cuenca Mediterránea Occidental, la ecología de la familia endémica Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta) es poco conocida. La aplicación de esta aproximación comparativa a los principales clados de Hormogastridae permitiría una mejor comprensión de sus preferencias y diferencias ecológicas. Ciento veinticuatro datos de presencia pertenecientes a cuatro de los clados dentro de esta familia de lombrices de tierra fueron usados como entrada para modelos de MaxEnt independientes, incluyendo siete variables predictoras. La amplitud y solapamiento de nicho y los tests de identidad fueron calculados en ENMtools; también se llevó a cabo un análisis espacial de componentes principales (spatial Principal Components Analysis, sPCA) para contrastar con los nichos realizados. Las áreas de elevada adecuación predichas variaron en su capacidad para reflejar las áreas de distribución conocidas de los clados. Los diferentes análisis señalaron diferentes preferencias ecológicas y divergencia ecológica significativa en los cuatro clados. Estos resultados son un ejemplo de inferencia ecológica a escala amplia en fauna del suelo hecho posible por esta metodología prometedora, y muestran cómo la caracterización ecológica de unidades taxonómicas relevantes puede ser un apoyo útil para las revisiones sistemáticas.



## Original article

## Macroecological inferences on soil fauna through comparative niche modeling: The case of Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta)

Daniel F. Marchán <sup>a,\*</sup>, Pablo Refoyo <sup>a,1</sup>, Rosa Fernández <sup>b</sup>, Marta Novo <sup>c</sup>, Irene de Sosa <sup>a</sup>, Darío J. Díaz Cosín <sup>a</sup><sup>a</sup> Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/José Antonio Nováis 2, 28040 Madrid, Spain<sup>b</sup> Museum of Comparative Zoology, Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, 26 Oxford Street, Cambridge, MA 02138, USA<sup>c</sup> Environmental Toxicology and Biology, Facultad de Ciencias UNED, C/Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 January 2016

Received in revised form

12 May 2016

Accepted 17 May 2016

Available online 25 May 2016

## Keywords:

Ecological niche models

ENMtools

Macroecological inferences

Soil fauna

Hormogastridae

## ABSTRACT

Ecological Niche Modeling (ENM) through MaxEnt and quantitative comparison techniques using ENMtools could facilitate ecological inferences in problematic soil dwelling taxa. Despite its ecological relevance in the Western Mediterranean basin, the ecology of the endemic family Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta) is poorly known. Applying this comparative approach to the main clades of Hormogastridae would allow a better understanding of their ecological preferences and differences. One hundred twenty-four occurrence data belonging to four clades within this earthworm family were used as input to infer separate MaxEnt models, including seven predictor variables. Niche breadth, niche overlap and identity tests were calculated in ENMtools; a spatial Principal Components Analysis (sPCA) was performed to contrast with the realized niches. The highly suitable predicted ranges varied in their ability to reflect the known distribution of the clades. The different analyses pointed towards different ecological preferences and significant ecological divergence in the four above-mentioned clades. These results are an example of wide-scale ecological inferences for soil fauna made possible by this promising methodology, and show how ecological characterization of relevant taxonomic units could be a useful support for systematic revisions.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Macroecological studies comparing the ecological preferences of different soil taxa are almost absent from the literature (but see Ref. [1]): this is not necessarily a case of a lack of interest for this community, but most probably related to the difficulty of their study [2].

One approach which has facilitated the ecological inferences in these problematic groups is Ecological Niche Modeling (ENM), with MaxEnt [3] standing out among the different methodologies due to

its high performance when including presence data only. It has been implemented in several groups (ground beetles [4], termites [5], millipedes [6]) including earthworms [7]: used MaxEnt to study the effect of large-scale ecological variables in the distribution of *Hormogaster elisae*, corroborating its high predictive power and the ability to reflect accurately its soil preferences.

Additionally, the implementation of several existing indices and statistical tests in the software ENMtools [8] has allowed the quantitative comparison of Ecological Niche Models (ENMs) between related species, including niche overlap, niche breadth and testing for statistically significant differentiation. Some recent studies have proven the usefulness of these methodologies to answer diverse biological questions, applying them to different animal groups. For example [9], found ecological niche differentiation in two cryptic beetle species, using the fact as support for their status as valid species. Ref. [10] studied niche overlap and niche breadth in three cryptic bat species complexes, as part of their research on how environmental factors and ecological interactions influenced their speciation. However, these promising

**Abbreviations:** ENM, Ecological Niche Modeling; sPCA, Spatial Principal Component Analysis; ROC-AUC, Receiver Operating Characteristic-Area Under the Curve, AUC in shorter form; TRANGE, Mean Diurnal Range; ISOTHER, Isothermality; TCOLD, Mean Temperature of the Coldest Quarter; PRDRY, Precipitation of Driest Month; LITHO, Lithology; VEGET, Land cover; ANTHRO, Human influence; HGI, Highest gain in isolation; HDGO, Highest decrease in gain when omitted.

\* Corresponding author.

E-mail address: [danifermch@gmail.com](mailto:danifermch@gmail.com) (D.F. Marchán).<sup>1</sup> Daniel F. Marchán and Pablo Refoyo contributed equally.

## Supplementary Material 1

Clade	Lat.	Long.	Species	Source
Central Iberia	40,4806	-3,2425	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,4306	-3,9250	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,8272	-3,4219	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,7394	-3,5647	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,5197	-3,7950	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,5975	-3,4117	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,8569	-3,6217	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,9475	-3,6211	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,9392	-3,5939	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,5100	-3,5331	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,8128	-3,6017	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	41,3864	-3,4283	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,3447	-4,0133	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	41,1850	-3,6186	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,7750	-3,7783	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,6128	-3,6781	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	40,8019	-3,6219	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Novo <i>et al.</i> 2010
Central Iberia	41,2983	-2,8683	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	41,0522	-4,1000	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,5422	-3,6844	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	41,0250	-2,9928	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,8222	-3,6492	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,9444	-3,6447	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014

Central Iberia	40,9481	-3,6947	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,7903	-3,7081	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,8928	-4,1331	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,7097	-3,4367	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,9492	-3,7631	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,7931	-3,7461	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,9492	-3,7303	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,5189	-3,7622	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,5175	-3,7514	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,5194	-3,7347	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,5331	-3,7111	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	41,1008	-3,8128	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,8017	-3,6906	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,7953	-3,7028	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,7972	-3,6997	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,9661	-3,2531	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,6000	-3,7714	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	41,3644	-3,1192	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	41,2364	-3,7622	<i>Hormogaster elisae</i> complex	Marchán <i>et al.</i> 2014
Central Iberia	40,9453	-3,7203	<i>Hormogaster elisae</i> complex	New
Central Iberia	40,9507	-3,7103	<i>Hormogaster elisae</i> complex	New
Northeastern Iberia	42,4394	-2,8385	<i>Hormogaster riojana</i>	Novo <i>et al.</i> 2011
Northeastern Iberia	41,8513	1,3279	<i>Hormogaster arenicola</i>	Novo <i>et al.</i> 2011
Northeastern Iberia	41,8014	2,3477	<i>Hormogaster catalaunensis</i>	Novo <i>et al.</i> 2011

Northeastern Iberia	40,4564	0,2831	<i>Hormogaster</i> sp	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	42,1699	0,3315	<i>Hormogaster eserana</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	42,1180	-0,2485	<i>Hormogaster huescana</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	42,3906	-0,3725	<i>Hormogaster pretiosiformis</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	42,0287	1,7121	<i>Hormogaster sylvestris</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	42,5852	-1,8582	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	42,5222	-0,4859	<i>Hormogaster oroeli</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	41,9896	0,9139	<i>Hormogaster pretiosa</i> var.	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	40,5636	-0,0177	<i>Hormogaster castillana</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	42,2250	2,2493	<i>Hormogaster abbatissae</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	42,1848	0,9033	<i>Hormogaster</i> sp	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	42,2319	-2,6264	<i>Hormogaster ireguana</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	39,8276	-0,2612	<i>Hormogaster pretiosa arrufati</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	41,2442	0,5538	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	42,0503	2,8683	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	41,8703	2,1162	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	40,7970	0,4550	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	41,9712	2,6759	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	41,6198	2,5731	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	41,4150	2,0978	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	41,1307	-0,0028	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	42,4689	3,1523	<i>Hormogaster gallica</i>	Novo et al. 2011
Northeastern Iberia	43,0387	2,9479	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	42,7573	2,8863	<i>Hormogaster</i> sp	New

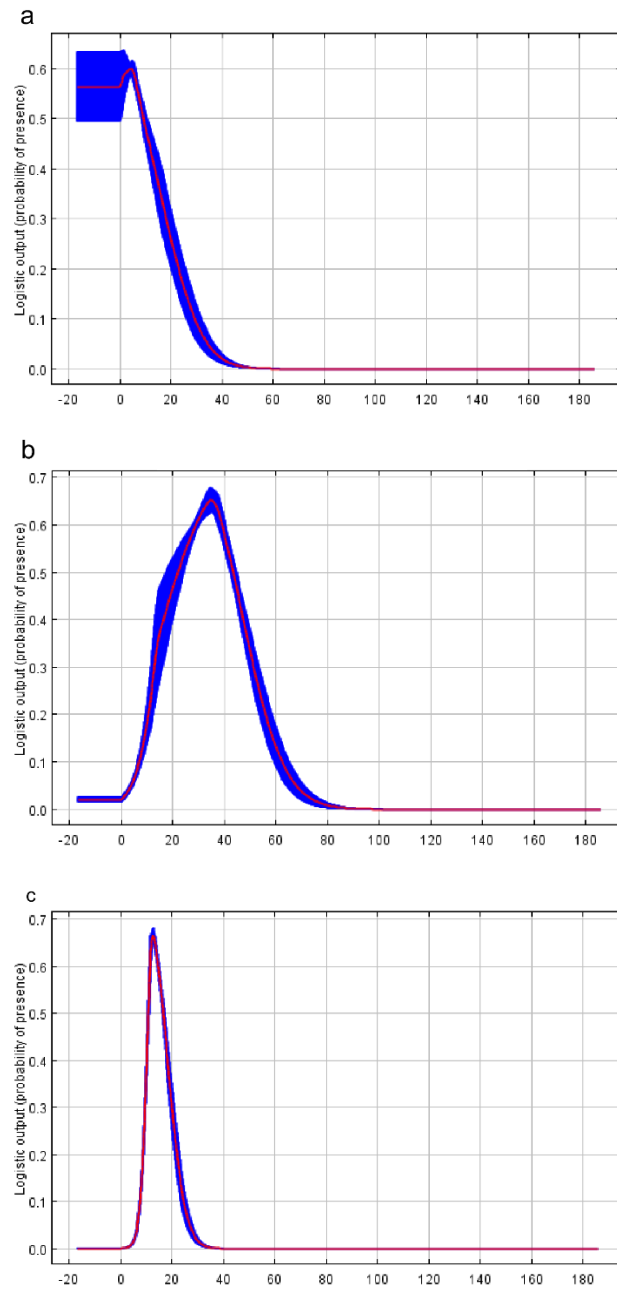
Northeastern Iberia	42,8802	2,1700	<i>Hormogaster pretiosa nigra</i>	Novo <i>et al.</i> 2011
Northeastern Iberia	41,9741	2,6708	<i>Hormogaster</i> sp	New
Northeastern Iberia	42,2056	0,9365	<i>Hormogaster</i> sp	New
Disjunct	41,3909	1,8276	<i>Hormogaster najaformis</i>	Novo <i>et al.</i> 2011
Disjunct	41,8076	2,0490	<i>Hormogaster</i> sp	New
Disjunct	41,4139	1,5903	<i>Hormogaster</i> sp	New
Disjunct	41,3177	1,7174	<i>Hormogaster</i> sp	New
Disjunct	41,2212	1,2170	<i>Hormogaster</i> sp	New
Disjunct	39,2365	8,5553	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Disjunct	38,9558	8,7534	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Disjunct	39,2583	8,6715	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Novo <i>et al.</i> 2011
Disjunct	39,5565	8,9717	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Disjunct	39,7281	8,9412	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Disjunct	41,5589	2,1998	<i>Hormogaster</i> sp	New
Disjunct	41,9741	2,6708	<i>Hormogaster regina</i>	New
Disjunct	41,1849	1,4515	<i>Hormogaster</i> sp	New
Disjunct	41,6853	1,8130	<i>Hormogaster</i> sp	New
Disjunct	41,9747	2,6933	<i>Hormogaster regina</i>	Rota <i>et al.</i> 2016
Disjunct	39,8842	8,7880	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Rota <i>et al.</i> 2016
Disjunct	39,7426	9,0214	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Rota <i>et al.</i> 2016
Disjunct	39,7084	8,9719	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Rota <i>et al.</i> 2016
Disjunct	39,5523	9,0767	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Rota <i>et al.</i> 2016
Disjunct	39,4536	9,0101	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Rota <i>et al.</i> 2016
Disjunct	39,2275	8,5442	<i>Hormogaster pretiosa</i>	Rota <i>et al.</i> 2016
Eastern Mediterranean	39,5565	8,9717	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	39,7281	8,9412	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	36,9124	7,6739	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	39,3233	8,5216	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2011
Eastern Mediterranean	39,4069	9,2079	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	39,4138	9,2148	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	40,1163	8,8648	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2011
Eastern Mediterranean	40,3088	9,1793	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	40,6000	8,2991	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2011

Eastern Mediterranean	40,7844	8,3872	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	40,8782	9,0470	<i>H. reddii</i> + <i>H. samnitica</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	40,7708	9,6542	<i>H. reddii</i> + <i>H. samnitica</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	40,8926	9,5978	<i>Hormogaster samnitica</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	40,9055	9,3842	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	40,9484	9,4988	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	41,0273	9,5293	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	41,4720	9,1052	<i>Hormogaster samnitica lirapora</i>	Novo <i>et al.</i> 2011
Eastern Mediterranean	42,5160	9,3482	<i>Hormogaster redii insularis</i>	Novo <i>et al.</i> 2011
Eastern Mediterranean	42,8040	10,4039	<i>Hormogaster samnitica</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	42,7834	11,2228	<i>Hormogaster samnitica</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	43,3566	10,7195	<i>Hormogaster samnitica</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	43,3336	10,5473	<i>Hormogaster samnitica</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	37,8773	12,5181	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	37,6072	13,0291	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	37,3165	13,6059	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	37,8689	15,1205	<i>Hormogaster redii</i>	Novo <i>et al.</i> 2014
Eastern Mediterranean	39,7084	8,9719	<i>Hormogaster redii</i>	Rota <i>et al.</i> 2016
Eastern Mediterranean	39,5523	9,0767	<i>Hormogaster redii</i>	Rota <i>et al.</i> 2016
Eastern Mediterranean	39,4536	9,0101	<i>Hormogaster redii</i>	Rota <i>et al.</i> 2016

**Table S1.** Presence data used as input for the ecological niche models of the four *Hormogaster* clades, species assignment and source. Color code corresponds to the one used through the paper.



## Supplementary material 2



**Figure 1.** Response curves of the variable Precipitation of the Driest Month (PRDRY) from the Ecological Niche Models of a) Tyrrenian clade b) Northeastern Iberian clade c) Central Iberia clade. Probability of presence above 0.5 is greater than explained by random, meaning the associated values of the variable are favorable to the presence of the clade. The curves show the mean response of the 10 replicate Maxent runs (red) and the mean +/- one standard deviation (blue).

# **Capítulo V- Evaluando presiones evolutivas y señal filogenética en lombrices de tierra: un caso de estudio.**

## **El número de láminas del tiflosol en Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta)**

### **Resumen**

Los métodos filogenéticos comparados han sido raramente utilizados para estudiar la correlación entre características fenotípicas y variables ambientales en invertebrados. Dada la extendida convergencia y conservadurismo de los caracteres morfológicos estudiados en lombrices de tierra, estos métodos comparados podrían ser útiles para mejorar nuestra comprensión de su evolución y su sistemática. Uno de los caracteres morfológicos más prominentes en la familia Hormogastridae, endémica del Mediterráneo, es su tiflosol multilamelar, tradicionalmente considerado una adaptación a suelos pobres en nutrientes. Se probó la correlación del tamaño corporal y las características del suelo con el número de laminillas del tiflosol mediante un análisis filogenético de mínimos cuadrados generalizados (phylogenetic generalized least squares, PGLS). Se obtuvo una hipótesis filogenética ultramétrica con una secuencia de ADN de 2580 pdb de 90 poblaciones, que se usó en combinación con tres variables morfológicas y 11 variables del suelo. El modelo mejor soportado (según el criterio de información de Akaike) se obtuvo optimizando los parámetros  $\lambda$  (lambda),  $\kappa$  (kappa) y  $\delta$  (delta). La señal filogenética fue fuerte para el número de laminillas del tiflosol y el peso corporal promedio, y fue menor para las variables del suelo. El incremento del peso corporal pareció ser la principal presión evolutiva tras el incremento en el número de laminillas del tiflosol, teniendo la textura y riqueza del suelo un efecto más débil pero

significativo. La información sobre la tasa evolutiva del número de laminillas del tiflosol sugirió que la evolución temprana de este carácter podría haber tenido un gran peso en su variabilidad, como suele encontrarse en las radiaciones adaptativas. Este trabajo destaca la importancia de implementar el método filogenético comparado para probar hipótesis evolutivas en taxones de invertebrados.

# Evaluating evolutionary pressures and phylogenetic signal in earthworms: a case study – the number of typhlosole lamellae in Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta)

DANIEL F. MARCHÁN<sup>1\*</sup>, MARTA NOVO<sup>2</sup>, ROSA FERNÁNDEZ<sup>3</sup>, IRENE DE SOSA<sup>1</sup>, DOLORES TRIGO<sup>1</sup> and DARÍO J. DÍAZ COSÍN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/José Antonio Nováis 2, 28040 Madrid, Spain*

<sup>2</sup>*Environmental Toxicology and Biology, Facultad de Ciencias UNED, C/Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain*

<sup>3</sup>*Museum of Comparative Zoology, Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, 26 Oxford Street, Cambridge, MA 02138, USA*

Received 24 August 2015; revised 26 January 2016; accepted for publication 7 February 2016

Rarely have phylogenetic comparative methods been used to study the correlation between phenotypic traits and environmental variables in invertebrates. With the widespread convergence and conservativeness of the morphological characters used in earthworms, these comparative methods could be useful to improve our understanding of their evolution and systematics. One of the most prominent morphological characters in the family Hormogastridae, endemic to Mediterranean areas, is their multilamellar typhlosole, traditionally thought to be an adaptation to soils poor in nutrients. We tested the correlation of body size and soil characteristics with the number of typhlosole lamellae through a phylogenetic generalized least squares (PGLS) analysis. An ultrametric phylogenetic hypothesis was built with a 2580-bp DNA sequence from 90 populations, used in combination with three morphological and 11 soil variables. The best-supported model, based on the Akaike information criterion, was obtained by optimizing the parameters lambda ( $\lambda$ ), kappa ( $\kappa$ ), and delta ( $\delta$ ). The phylogenetic signal was strong for the number of typhlosole lamellae and average body weight, and was lower for soil variables. Increasing body weight appeared to be the main evolutionary pressure behind the increase in the number of typhlosole lamellae, with soil texture and soil richness having a weaker but significant effect. Information on the evolutionary rate of the number of typhlosole lamellae suggested that the early evolution of this character could have strongly shaped its variability, as is found in an adaptive radiation. This work highlights the importance of implementing the phylogenetic comparative method to test evolutionary hypotheses in invertebrate taxa.

© 2016 The Linnean Society of London, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2016  
doi: 10.1111/zoj.12410

**ADDITIONAL KEYWORDS:** Hormogastridae – morphological evolution – phylogenetic generalized least squares – typhlosole.

## INTRODUCTION

Comparative methods have been used extensively on some animal groups, such as vertebrates, to study the correlation between phenotypic traits and

environmental variables (Schondube, Herrera-M & del Rio, 2001; Díaz, 2002; Medina *et al.*, 2012; Prevosti *et al.*, 2012; Boyles *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2013; Riek & Geiser, 2014). Because of the non-independence of species with shared evolutionary history, phylogenetic comparative methods are needed to take their relationships into account (Felsenstein,

\*Corresponding author. E-mail: danifermch@gmail.com

## Supplementary material 1

Code	Species	Locality	Coordinates	COI	16S	28S	H3
AEDOr ed	<i>H. redii</i>	Aedough, Algeria	7.6739 36.9124	KF9748 01	KF97499 3	KF97525 2	KF97517 7
AILO1	<i>Ailoscolex lacteospumousus</i>	Audinac-les-Bains, france	1.1931 43.0133	KP9441 99	KP94420 2	KP94420 4	KP94420 6
ALE4	<i>H. riojana</i>	Alesanco, Spain	-2.838479 42.439361	HQ6219 70	HQ62186 2	HQ6219 41	HQ6219 99
ALG1	<i>H. redii</i>	Alghero, Sardinia	8.299083 40.599972	HQ6219 71	HQ62186 3	HQ6219 42	HQ6220 00
BIO2	<i>H. arenicola</i>	Biosca, Spain	1.327896 41.851273	HQ6219 72	HQ62186 5	HQ6219 43	HQ6220 03
BRU1	<i>H. catalaunensis</i>	El Brull, Spain	2.347653 41.80137	HQ6219 73	HQ62186 6	HQ6219 44	HQ6220 05
BSM1	<i>H. gallica</i>	Banyules-sûr-Mer, France	3.152286 42.468894	HQ6219 74	HQ62186 7	HQ6219 45	HQ6220 06
CCRUr ed	<i>H. redii</i>	La Cruzza, Sardinia	8.387222 40.784361	KF9748 04	KF97499 6	KF97525 4	KF97518 0
CDOL Dred	<i>H. redii</i>	Dolianova 2, Sardinia	9.214771 39.413821	KF9748 07	KF97499 9	KF97525 6	KF97518 3
CDOL Ured	<i>H. redii</i>	Dolianova1, Sardinia	9.207895 39.406876	KF9748 19	KF97501 1	KF97525 8	KF97518 6
CER2	<i>H. castillana</i>	Cervera del Maestre, Spain	0.283063 40.45641	HQ6219 75	HQ62186 8	HQ6219 46	HQ6220 08
CISTsa m	<i>H. samnitica</i>	Puerto Istana, Sardinia	9.597778 40.892611	KF9748 31	KF97502 3	KF97526 0	KF97518 9
COLAr ed	<i>H. redii</i>	Ola, Sardinia	9.179346 40.308755	KF9748 41	KF97503 3	KF97526 2	KF97519 3
COLBr ed	<i>H. redii</i>	Olbia, Sardinia	9.498756 40.948386	KF9748 50	KF97504 2	KF97526 4	KF97519 1
CPRlre d	<i>H. redii</i>	Priatu, Sardinia	9.384180 40.905508	KF9748 58	KF97505 0	KF97526 6	KF97519 7
CROTr ed	<i>H. redii</i>	Porto Rotondo, Sardinia	9.529347 41.027324	KF9748 59	KF97505 1	KF97526 7	KF97519 8
CSEGP re	<i>H. pretiosa</i>	Segariu, Sardinia	8.975 39.5633	KF9748 71	KF97506 3	KF97526 9	KF97520 1
CSEGr ed	<i>H. redii</i>	Segariu, Sardinia	8.975 39.5633	KF9748 77	KF97506 7	KF97527 0	KF97520 4
CSETp re	<i>H. pretiosa</i>	Setzu, Sardinia	8.9412 39.7281	KF9748 90	KF97507 9	KF97527 4	KF97521 0
CSETr ed	<i>H. redii</i>	Setzu, Sardinia	8.9412 39.7281	KF9748 82	KF97507 1	KF97527 2	KF97520 7
<b>CSP1, 2</b>	<b><i>H. castillana</i></b>	<b>Caspe, Spain</b>	<b>-0.002806 41.130688</b>	<b>KT2463 76-7</b>	<b>KT24639 6-7</b>	<b>KT2464 21-2</b>	<b>KT2464 46-7</b>
CTAN pre	<i>H. pretiosa</i>	Tani, Sardinia	8.5553 39.2365	KF9749 01	KF97508 7	KF97527 5	KF97521 3
CTEMr ed	<i>H. redii</i>	Tempio, Sardinia	9.046967 40.878209	KF9749 18	KF97510 4	KF97527 9	KF97521 7
CTEMs am	<i>H. samnitica</i>	Tempio, Sardinia	9.046967 40.878209	KF9749 09	KF97509 5	KF97527 7	KF97521 4
CTEO ed	<i>H. redii</i>	San Teodoro, Sardinia	9.654184 40.770751	KF9749 39	KF97512 5	KF97528 3	KF97522 3
CTEOs am	<i>H. samnitica</i>	San Teodoro, Sardinia	9.654184 40.770751	KF9749 30	KF97511 6	KF97528 1	KF97522 0
CTEU re	<i>H. pretiosa</i>	Teulada, Sardinia	8.7534 38.9558	KF9749 51	KF97513 7	KF97528 5	KF97522 6
EANC 1	<i>H. elisae</i>	Anchuelo, Spain	-3.2425 40.4806	EF6538 72	GQ40975 4	GQ4096 57	HQ6220 01
EBOA 1	<i>H. elisae</i>	Boadilla del Monte, Spain	-3.925 40.4306	GQ4096 64	GQ40970 4	GQ4096 56	HQ6220 04
ECAB1	<i>H. elisae</i>	La Cabrera, Spain	-3.6217 40.8569	GQ4096 89	GQ40972 9	GQ4096 53	HQ6220 07
EFRE1	<i>H. elisae</i>	Fresno del Torote, Spain	-3.4117 40.5975	GQ4096 98	GQ40972 3	GQ4096 53	HQ6220 09
EJAR2	<i>H. elisae</i>	Paracuellos del Jarama, Spain	-3.5331 40.51	GQ4096 65	GQ40974 6	GQ4096 53	HQ6220 13
ELOZ1	<i>H. elisae</i>	Lozoyuela, Spain	-3.6211 40.9475	EF6538 88	GQ40972 5	GQ4096 53	HQ6220 16
EMCN sam	<i>H. samnitica</i>	Marciana, Elba	10.403894 42.803981	KF9749 62	KF97514 6	KF97528 7	KF97522 9

EMOL 2	<i>H. elisae</i>	El Molar, Spain	-3.5647 40.7394	EF6538 78	GQ40973 2	GQ4096 53	HQ6220 19
ENAV 1	<i>H. elisae</i>	Navas de Buitrago, Spain	-3.5939 40.9392	GQ4096 83	GQ40973 0	GQ4096 53	HQ6220 21
EPAR1	<i>H. elisae</i>	El Pardo, Spain	-3.795 40.5197	EF6538 99	HQ62187 9	GQ4096 55	HQ6220 24
ERED2	<i>H. elisae</i>	Redueña, Spain	-3.6017 40.8128	EF6538 85	GQ40975 2	GQ4096 53	HQ6220 29
ESEV1	<i>H. elisae</i>	Sevilla la Nueva, Spain	-4.0133 40.3447	EF6539 05	GQ40970 7	GQ4096 56	HQ6220 31
ESIG1	<i>H. elisae</i>	Sigüero, Spain	-3.6186 41.185	EF6538 94	GQ40971 0	GQ4096 54	HQ6220 33
ESOT2	<i>H. elisae</i>	Soto del Real, Spain	-3.7783 40.775	GQ4097 02	GQ40971 9	GQ4096 54	HQ6220 34
ETRE2	<i>H. elisae</i>	Tres Cantos, Spain	-3.6781 40.6128	GQ4096 78	GQ40973 8	GQ4096 53	HQ6220 38
EUCE2	<i>H. elisae</i>	Cubillo de Uceda, Spain	-3.4219 40.8272	GQ4096 92	GQ40972 0	GQ4096 53	HQ6220 39
EVEN2	<i>H. elisae</i>	Venturada, Spain	-3.6219 40.8019	GQ4096 74	GQ40975 3	GQ4096 53	HQ6220 41
FONT 1	<b><i>Hormogaster spp.</i></b>	<b>Fontrubí, Spain</b>	<b>1.590305 41.413928</b>	<b>KT2463 78</b>	<b>KT24639 8</b>	<b>KT2464 23</b>	<b>KT2464 48</b>
GHI2	<i>H. redii</i>	Ghilarza, Sardinia	8.864798 40.116348	HQ6219 76	HQ62186 9	HQ6219 47	HQ6220 10
GRA1	<i>H. eserana</i>	Graus, Spain	0.331452 42.169943	HQ6219 77	HQ62187 0	HQ6219 48	HQ6220 11
HEST1 , 2	<b><i>Hormogaster spp.</i></b>	<b>L'Estany, Spain</b>	<b>2.116238 41.870272</b>	<b>KT246 379</b>	<b>KT24639 9-400</b>	<b>KT2464 24-5</b>	<b>KT2464 49-50</b>
HFLIX 1	<i>H. hispanica</i>	Flix, Spain	0.553836 41.244178	KT2463 80	KT24640 1	KT2464 26	KT2464 51
HMOI	<b><i>Hormogaster spp.</i></b>	<b>Moià, Spain</b>	<b>2.048976 41.807576</b>	<b>KT2463 81</b>	<b>KT24640 2</b>	<b>KT2464 27</b>	<b>KT2464 52</b>
HPA	<i>Hormogaster spp.</i>	River Ter, Spain	-	-	HQ62189 2	-	HQ6220 44
HRT4	<b><i>Hormogaster spp.</i></b>	<b>Medinya, Spain</b>	<b>2.868303 42.050311</b>	<b>KT2463 82</b>	<b>KT24640 3</b>	<b>KT2464 28</b>	<b>KT2464 53</b>
HRUD 1	<i>H. joseantonioi</i>	Rudilla, Spain	-0.982218 41.015466	KJ6326 74	KJ632684	KJ63268 6	KJ63268 8
HSIV1 , 2	<b><i>Hormogaster spp.</i></b>	<b>Sant Isclè de Vallalta, Spain</b>	<b>2.573115 41.61984</b>	-	<b>KT24640 4-5</b>	<b>KT2464 29-30</b>	<b>KT2464 54-5</b>
ICECsa m	<i>H. samnitica</i>	Cecina, Italy	10.547266 43.333631	KF9749 66	KF97515 0	KF97528 9	KF97523 3
IGELsa m	<i>H. samnitica</i>	Gello, Italy	10.719534 43.356588	KF9749 68	KF97515 2	KF97529 1	KF97523 5
IGL1	<i>H. redii</i>	Iglesias, Sardinia	8.521585 39.323267	HQ6219 78	HQ62187 1	HQ6219 49	HQ6220 12
IGROs am	<i>H. samnitica</i>	Grossetto, Italy	11.222823 42.783403	KF9749 70	KF97515 4	KF97529 3	KF97523 7
LAC2	<i>He. monicae</i>	Le Cardayre, France	0.8792 44.313	HQ6219 79	HQ62187 2	HQ6219 50	HQ6220 14
LARR 1, 2	<b><i>H. multilamella</i></b>	<b>Larraga, Spain</b>	<b>-1.858208 42.585236</b>	<b>KT2463 83-4</b>	<b>KT24640 6-7</b>	<b>KT2464 31-2</b>	<b>KT2464 56-7</b>
LOP1	<i>H. huescana</i>	Loporzano, Spain	-0.248501 42.117958	HQ6219 80	HQ62187 3	HQ6219 51	HQ6220 15
MAJ2	<i>H. sylvestris</i>	Montmajor, Spain	1.712149 42.028684	HQ6219 81	HQ62187 4	HQ6219 52	HQ6220 17
MND2	<i>He. monicae</i>	Mende, France	3.4616 44.4954	HQ6219 82	HQ62187 5	HQ6219 53	HQ6220 18
MON2	<i>H. pretiosiformis</i>	Monrepós, Spain	-0.372465 42.390565	HQ6219 83	HQ62187 6	HQ6219 54	HQ6220 20
NPOR C1	<b><i>Hormogaster spp.</i></b>	<b>Portel des Corbières, France</b>	<b>2.947892 43.038697</b>	<b>KT2463 85</b>	<b>KT24640 8</b>	<b>KT2464 33</b>	<b>KT2464 58</b>
NRIV4	<b><i>Hormogaster spp.</i></b>	<b>Rivesaltes, France</b>	<b>2.886342 42.757328</b>	<b>KT246 386</b>	<b>KT24640 9</b>	<b>KT2464 34</b>	<b>KT2464 59</b>
OEL2	<i>H. pretiosiformis oroeli</i>	Peña Oroel, Spain	-0.485862 42.522238	HQ6219 84	HQ62187 7	HQ6219 55	HQ6220 22
ORD1	<i>H. najiformis</i>	Ordal, Spain	1.827592 41.390915	HQ6219 85	HQ62187 8	HQ6219 56	HQ6220 23
PIG1	<i>Vygnisa vedovinii</i>	Pignans, France	6.21 43.3013	HQ6219 86	HQ62188 0	HQ6219 57	HQ6220 25

PRB1	<i>H. eserana</i>	Peralba, Spain	0.913906 41.989646	HQ6219 87	HQ62188 1	HQ6219 58	HQ6220 26
QLL1	<i>H. nigra</i>	Quillán, France	2.170000 42.880222	HQ6219 88	HQ62188 2	HQ6219 59	HQ6220 27
QUE1	<i>H. castillana</i>	Puerto Querol, Spain	-0.017653 40.563633	HQ6219 89	HQ62188 3	HQ6219 60	HQ6220 28
<b>ROUR 1, 2</b>	<b><i>Hormogaster</i> spp.</b>	<b>El Rourell, Spain</b>	<b>1.217028 41.221229</b>	<b>KT2463 88-9</b>	<b>KT24641 1-2</b>	<b>KT2464 36-7</b>	<b>KT2464 61-2</b>
SAGRr ed	<i>H. redii</i>	Agrigento, Sicily	13.605948 37.316528	KF9749 77	KF97516 1	KF97529 5	KF97524 1
SAN2	<i>H. abbatissae</i>	San Joan de les Abadesses, Spain	2.249311 42.224997	HQ6219 90	HQ62188 4	HQ6219 61	HQ6220 30
SGF1	<i>Vygnisa popi</i>	Sant Gely du Fesc, France	3.801 43.7053	HQ6219 91	HQ62188 5	HQ6219 62	HQ6220 32
SLINr ed	<i>H. redii</i>	Linguaglossa, Sicily	15.120528 37.868852	KF9749 79	KF97516 3	KF97529 7	KF97524 3
SMARr ed	<i>H. redii</i>	Marsala, Sicily	12.518086 37.877264	KF9749 82	KF97516 6	KF97529 9	KF97524 6
<b>SMIQ1 , 2</b>	<b><i>Hormogaster</i> spp.</b>	<b>Sant Miquel d'Ollerdolla, Spain</b>	<b>1.717436 41.317705</b>	<b>KT2463 90-1</b>	<b>KT24641 3-4</b>	<b>KT2464 38-9</b>	<b>KT2464 63-4</b>
SSAMr ed	<i>H. redii</i>	Sambuca, Sicily	13.029137 37.607243	KF9749 88	KF97517 2	KF97530 2	KF97524 9
TAL1	<i>H. castillana</i>	Talarn, Spain	0.903264 42.184848	HQ6219 92	HQ62188 6	HQ6219 63	HQ6220 35
TES1	<i>H. samnitica lirapora</i>	Col de la Testa, Corsica	9.105228 41.472000	HQ6219 93	HQ62188 7	HQ6219 64	HQ6220 36
TOR2	<i>H. ireguana</i>	Torreclilla en Cameros, Spain	-2.626448 42.231876	HQ6219 94	HQ62188 8	HQ6219 65	HQ6220 37
<b>TORT 1, 2</b>	<b><i>H. castillana</i></b>	<b>Tortosa, Spain</b>	<b>0.454965 40.797041</b>	<b>KT2463 92-3</b>	<b>KT24641 5-6</b>	<b>KT2464 40-1</b>	<b>KT2464 65-6</b>
UIX1	<i>H. castillana arrufati</i>	Vall d'Uixó, Spain	-0.261178 39.827598	HQ6219 95	HQ62188 9	HQ6219 66	HQ6220 40
VIL2	<i>Hormogaster</i> spp.	Villamassargia, Sardinia	8.6715 39.2583	HQ6219 98	HQ62189 3	HQ6219 69	HQ6220 45
<b>VLNA 1, 2</b>	<b><i>Hormogaster</i> spp.</b>	<b>Vilanna, Spain</b>	<b>2.675918 41.971154</b>	<b>KT2463 94-5</b>	<b>KT24641 7-8</b>	<b>KT2464 42-3</b>	<b>KT2464 67-8</b>
VPJ1	<i>H. insularis</i>	Volpajola, Corsica	9.348229 42.516000	HQ6219 96	HQ62189 0	HQ6219 67	HQ6220 42
<b>VVID1 , 2</b>	<b><i>Hormogaster</i> spp.</b>	<b>Vallvidrera, Spain</b>	<b>2.097812 41.414996</b>	<b>-</b>	<b>KT24641 9-20</b>	<b>KT2464 44-5</b>	<b>KT2464 69-70</b>
XAN2	<i>Xana omodeoi</i>	San Román, Spain	-5.086181 43.255798	HQ6219 97	HQ62189 1	HQ6219 68	HQ6220 43
Amyn	<i>Amyntas robustus</i>	-	-	EF0775 69	EF490524	-	EF49052 9
Atra	<i>Aporrectodea trapezoides</i>	-	-	JN8505 51	HQ62186 4	KC55709 8	HQ6220 02
Dicho	<i>Dichogaster saliens</i>	-	-	-	AF40657 3	-	AY1015 60
Lumb	<i>Lumbricus terrestris</i>	-	-	HQ6912 22	U24570	HQ6912 27	HQ6912 18
Ponto	<i>Pontodrilus litoralis</i>	-	-	-	AY34047 3	-	-
<b>PRPS</b>	<b><i>Prosellodrilus psammophilus</i></b>	<b>Farlete, Spain</b>	<b>-0.559076 41.691191</b>	<b>KT2463 87</b>	<b>KT24641 0</b>	<b>KT2464 35</b>	<b>KT2464 60</b>

**Table S1.** Sequences obtained for this work are shown in bold. Species names follow the provisional taxonomic revision proposed in Novo M (2010). Algunos aspectos de la biología evolutiva de la familia Hormogastridae Michaelsen, 1900: Filogenia, filogeografía y selección sexual. Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Spain

## Supplementary material 2

In order to test one of the hypothesis of this work, which was the correlation between the number of lamellae in the typhlosole of Hormogastridae and its surface, we measured the outline in cross section of the typhlosole of five different individuals.

These measurements were obtained from transversal sections in the segment just behind the clitellum, a region in which the typhlosole is usually strongly developed. These sections were photographed and measured using the software tpsDig2 (Rohlf).

Two of the measurements belonged to two different *Hormogaster elisae* individuals from the same population –Soto del Real- (number of typhlosole lamellae = 5). Two other belonged to two individuals from two populations of the same species group -Portel des Corbières, related to *H. nigra*; and Sant Isclé de Vallalta, related to *H. catalaunensis*- (number of typhlosole lamellae = 13), and the last one belonged to *H. najaformis* (number of typhlosole lamellae = 17).

The raw measurements (in centimeters) were scaled dividing by the body diameter in the transversal section, in order for them to be proportional to the size of the individual. The resulting values were featured as **relative surface** (table 1).

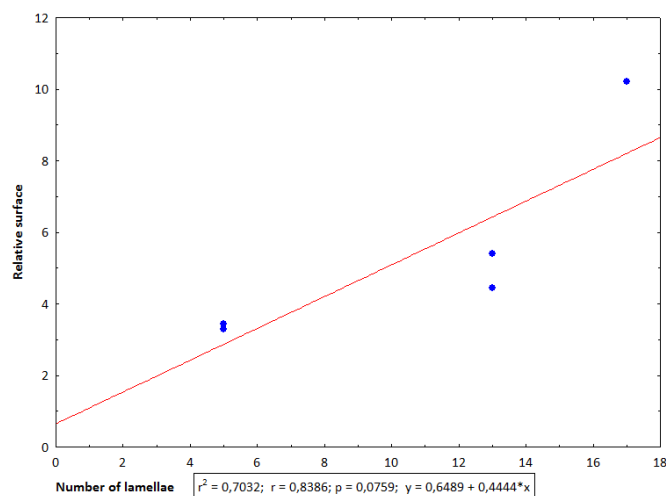
The raw measurements were also divided by the perimeter of the cross section of a hypothetical cylindrical typhlosole with the same diameter they showed, to represent the increase in surface provided by the presence of the longitudinal lamellae. The resulting values were featured as **surface increase** (table 1).



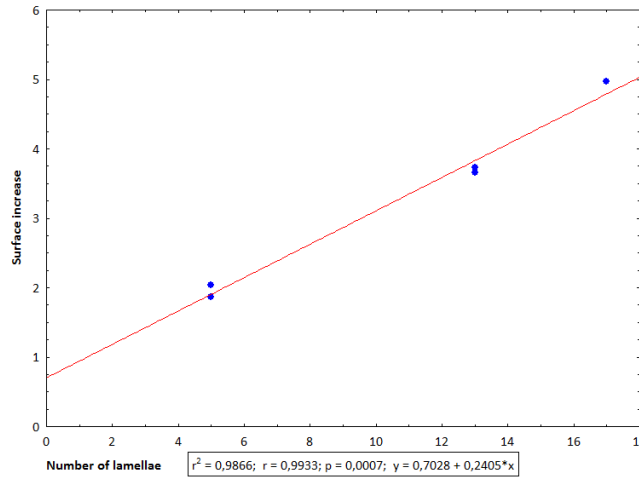
Individual	Typhlosole outline	Body diameter	Relative surface	Maximum diameter of typhlosole	Surface increase
<i>H. elisae</i> 1	1.98	0.6	3.3	0.31	2.04
<i>H. elisae</i> 2	2.4	0.7	3.45	0.41	1.86
Portel des Corbières	4.44	1	4.44	0.38	3.73
Sant Isclé de Vallalta	5.39	1	5.39	0.47	3.66
<i>H. najaformis</i>	11.24	1.1	10.22	0.72	4.97

**Table 1.** Measurements for the studied individuals.

The correlation between number of lamellae and relative surface was strong but not significant ( $p=0.0759$ , figure 1), while the correlation between number of lamellae and surface increase was strikingly strong ( $r^2=0.9866$ ) and highly significant ( $p=0.0007$ , figure 2).



**Figure 1.** Correlation between the number of typhlosole lamellae and the typhlosole surface scaled according to the diameter of the body (relative surface).



**Figure 2.** Correlation between the number of typhlosole lamellae and the increase of surface from a hypothetical round typhlosole of the same diameter (surface increase).

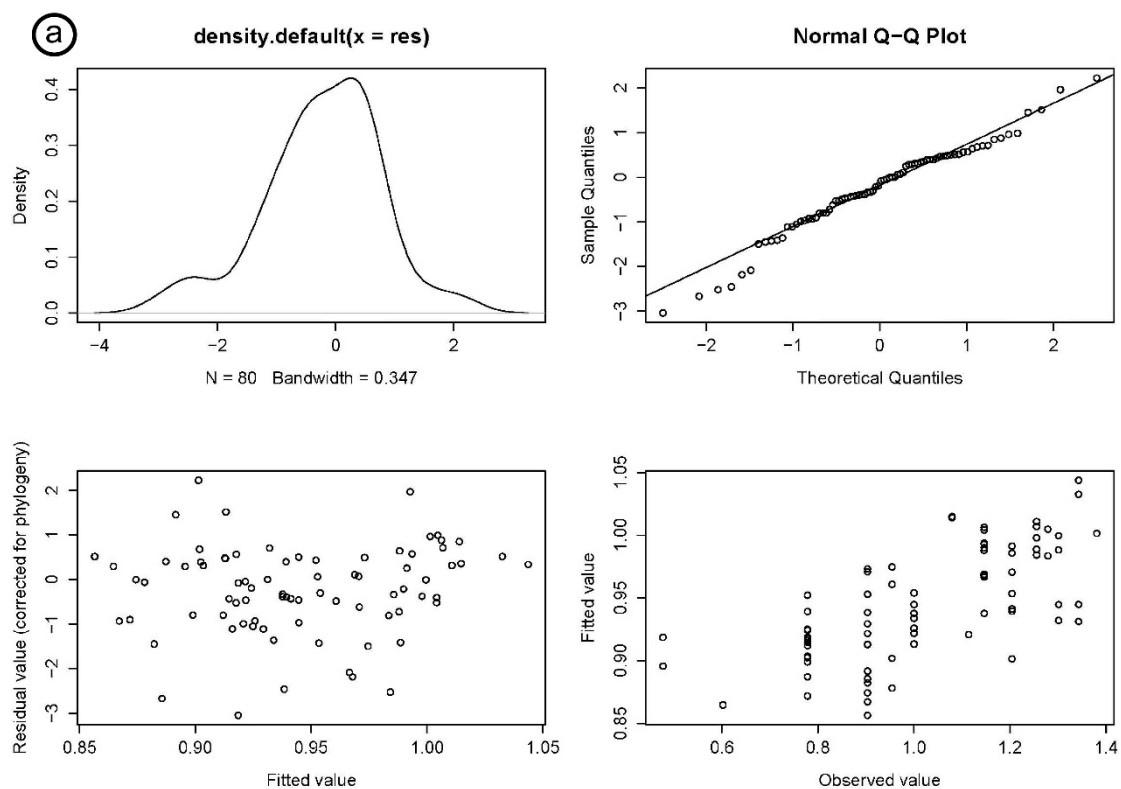
While the number of individuals was low (due to the arduous process required for each measurement) to draw definitive conclusions, the latter correlation suggested the number of lamellae explains accurately the biologically relevant phenomenon of surface increase. Considering the easiness of the measurement of the number of typhlosole lamellae and its homogeneity at population/specific level, in addition to these results, it appears to be an efficient proxy of the typhlosole development in Hormogastridae.

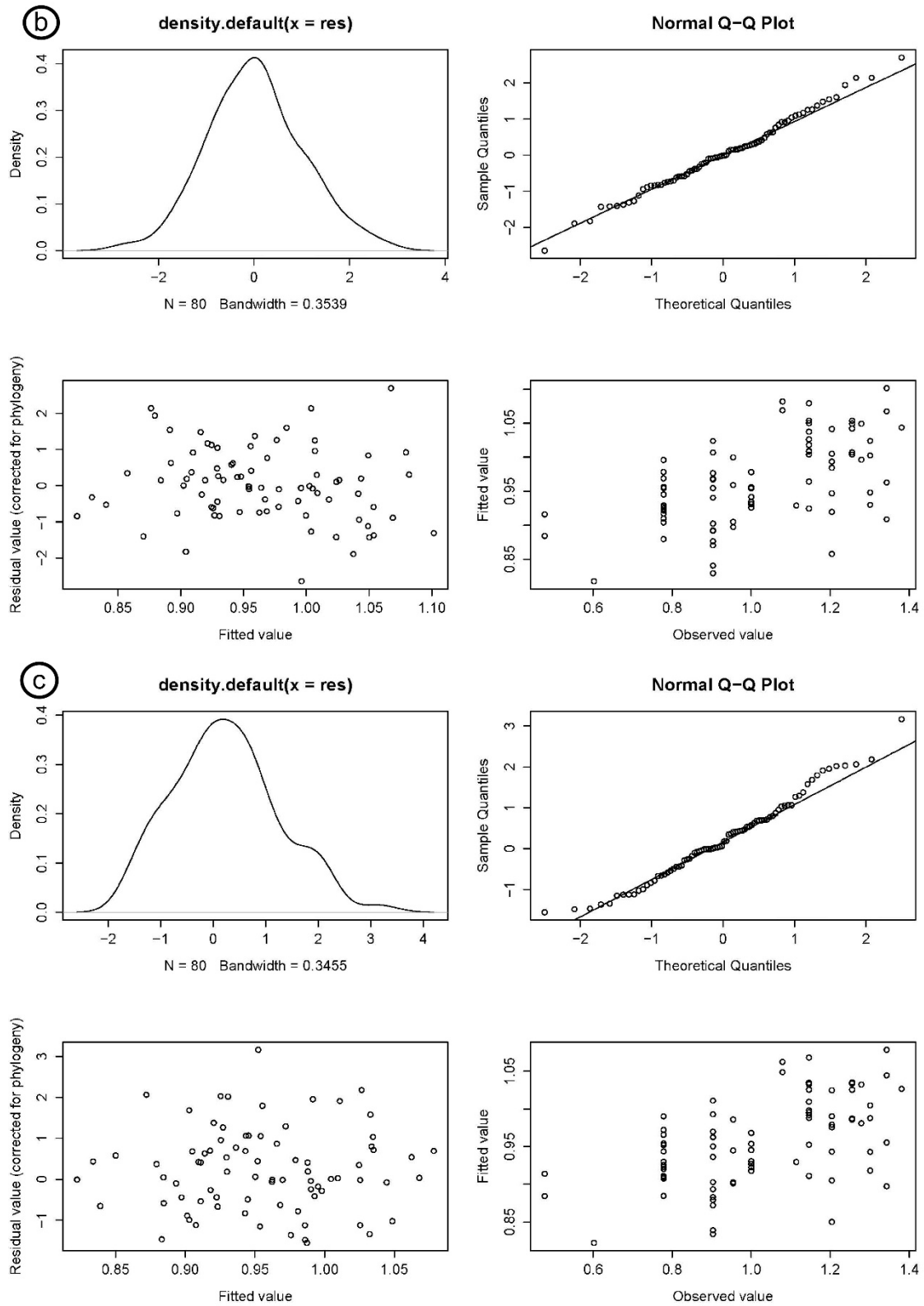
Other interesting observation derived from the data is the complex relationship between body and typhlosole diameter: earthworms with the same or similar body diameter can show typhlosoles with very different diameters, while typhlosoles of the same diameter can be found in earthworms of very different body width. This complex relationship is also found for the diameter of the typhlosole and the number of lamellae: typhlosoles with the same diameter in cross section showed a very different number of lamellae, while in other cases an increase in the number of lamellae involved a significant increase in the diameter of the typhlosole. These findings, while outside of the main scope of this work, highlight the complexity of the multilamellar typhlosole as an organ and leave questions open for future studies.

### Supplementary material 3

Variable	Soil texture	Soil richness	Add. soil texture
CoarseSa	-0,829669	0,121548	-0,275525
FineSa	0,010079	0,556410	0,656113
TotalSa	-0,802478	0,453395	0,057213
SoarseSi	0,196850	-0,224763	0,821997
FineSi	0,906561	-0,039859	-0,212869
TotalSi	0,934956	-0,114570	0,195478
Clay	-0,394082	-0,563673	-0,000622
Carb	0,197701	-0,803897	-0,204856
Nitro	0,178103	-0,897485	0,032773
C/N	-0,048912	0,714061	-0,247027
pH	0,718142	0,258696	0,230649
Expl.Var	3,811397	2,941429	1,426139
Prp.Totl	0,346491	0,267403	0,129649

Factor loadings of the variables on the first three factors, after normalized varimax rotation. Marked loadings are  $>0.7$





Model diagnostics after optimization of a)  $\lambda$ , b)  $\kappa$  and c)  $\delta$

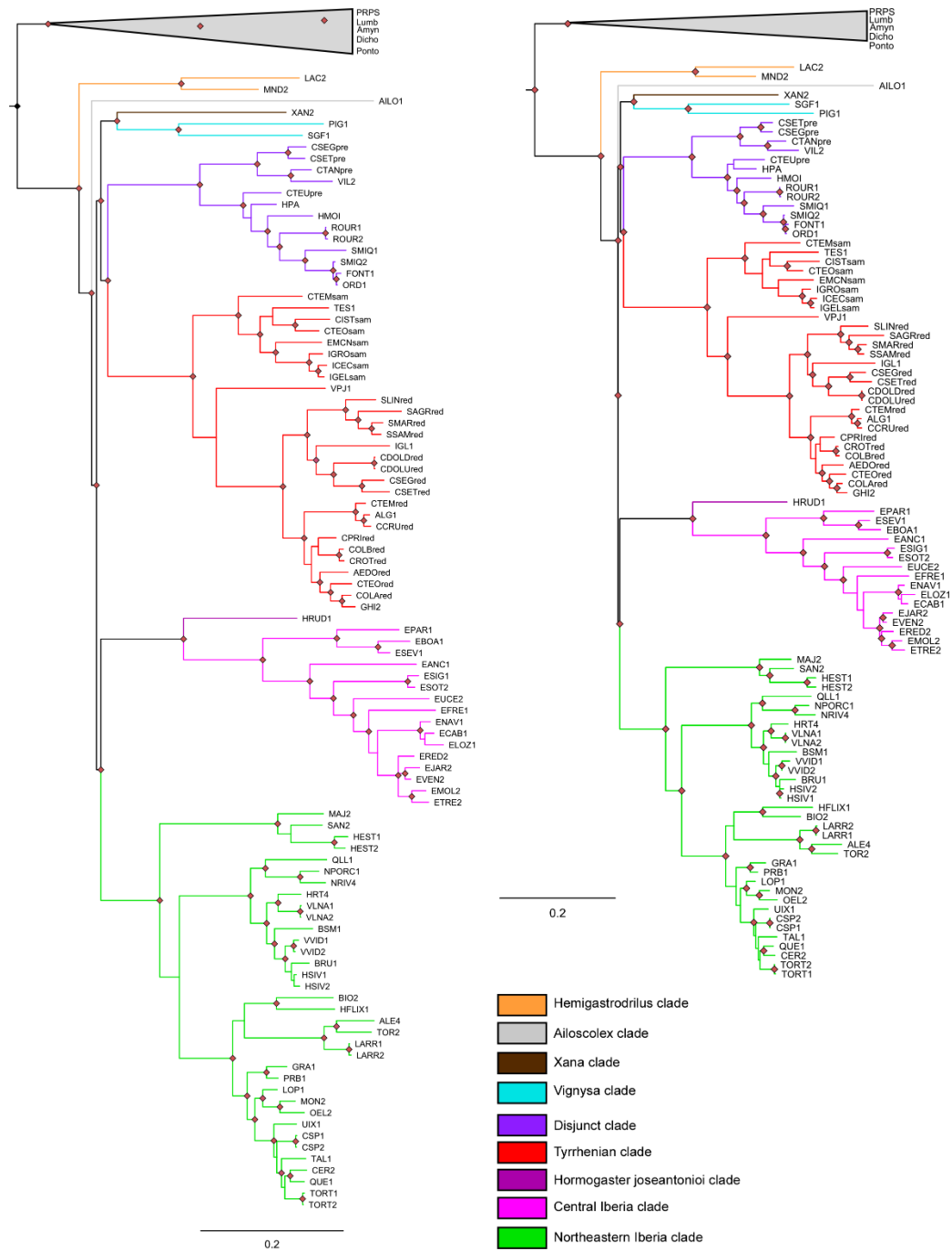
## Supplementary material 4

Population	Species	Locality	N	Typhl. Lam.	Av. weight	N.r of segments	% Coarse Sand	% Fine Sand	% Total Sand	% Coarse Silt	% Fine Silt	% Total Silt	% Clay	% C	%N	C/N	pH
AILO1	<i>A. lacteospumosus</i>	Audinac-les-Bains, France	3	3	0.53	107	6.09	7.54	13.63	8.55	37.18	45.73	40.64	5.19	0.47	10.93	7.32
ALE4	<i>H. riojana</i>	Alesanco, Spain	a	15	9.25	260	9.24	25.12	34.36	55.38	1.86	57.24	8.4	1.63	0.3	5.33	7.33
BIO2	<i>H. arenicola</i>	Biosca, Spain	a	15	14.25	417	7.53	14.1	21.62	4.36	69.01	73.37	5.01	3.86	1.2	3.21	7.19
BRU1	<i>H. catalaunensis</i>	El Brull, Spain	a	13	17.27	539	47.5	12.61	60.11	5.25	17.72	22.97	16.92	4.76	1.32	3.61	4.76
BSM1	<i>H. gallica</i>	Banyules-sûr-Mer, France	b	13	14.5	288	25.21	8.33	33.55	7.11	36.49	43.6	22.85	3.88	0.94	4.13	5.51
CCRUred	<i>H. redii</i>	La Cruzza, Sardinia	1	7	17.49	528	36.29	25.15	61.44	11.75	19.72	31.47	7.09	1.55	0.15	10.33	7.31
CDOLDred	<i>H. redii</i>	Dolianova 2, Sardinia	1	7	2.52	311	49.55	19.8	69.35	2.08	28.58	30.65	0	0.82	0.06	13.67	6.84
CDOLUred	<i>H. redii</i>	Dolianova1, Sardinia	1	9	4.81	336	51.41	11.58	62.99	4	17.72	21.73	15.29	2.05	0.12	17.08	5.93
CER2	<i>H. castillana</i>	Cervera del Maestre, Spain	2	21	51.42	481	20.41	14.22	34.64	9.24	40.34	49.58	15.78	2.7	0.54	5.01	7.5
CISTsam	<i>H. samnitica</i>	Puerto Istana, Sardinia	5	7	1.68	282	52.74	10.12	62.87	3.38	17.82	21.2	15.93	1.58	0.14	11.29	5.33
COLAred	<i>H. redii</i>	Ola, Sardinia	4	7	17.45	394	49.43	15.7	65.13	1.93	16.12	18.05	16.81	2.17	0.13	16.68	5.91
COLBred	<i>H. redii</i>	Olbia, Sardinia	2	7	5.82	265	53.98	17.44	71.42	1.99	11.73	13.72	14.86	1.71	0.17	10.06	5.71
CPRIred	<i>H. redii</i>	Priatu, Sardinia	1	7	5.57	309	71.77	8.61	80.38	1.56	8.25	9.81	9.81	1.53	0.07	21.86	6.65
CSEGpre	<i>H. pretiosa</i>	Segariu, Sardinia	5	13	38.82	636	39.64	15.89	55.53	21.06	18.95	40.01	4.46	1.69	0.05	33.8	7.34
CSEGred	<i>H. redii</i>	Segariu, Sardinia	1	9	7.14	261	39.64	15.89	55.53	21.06	18.95	40.01	4.46	1.69	0.05	33.8	7.34
CSETpre	<i>H. pretiosa</i>	Setzu, Sardinia	2	13	31.53	596	25.41	27.13	52.54	1.78	45.68	47.46	0	1.83	0.16	11.44	7.78
CSETred	<i>H. redii</i>	Setzu, Sardinia	2	7	6.65	303	25.41	27.13	52.54	1.78	45.68	47.46	0	1.83	0.16	11.44	7.78
CSP1	<i>H. castillana</i>	Caspe, Spain	2	15	11.78	358	5.38	23.21	28.59	6.51	63.15	69.66	1.75	1.05	0.06	16.84	7.7
CTANpre	<i>H. pretiosa</i>	Tani, Sardinia	1	11	38.45	594	34.54	19.86	54.4	7.42	13.98	21.4	24.2	1.31	0.14	9.34	7.3
CTEMred	<i>H. redii</i>	Tempio, Sardinia	2	7	7.93	379	45.72	19.25	64.97	7.11	12.25	19.36	15.67	2.44	0.15	16.27	5.47
CTEMsam	<i>H. samnitica</i>	Tempio, Sardinia	5	7	2.11	214	45.72	19.25	64.97	7.11	12.25	19.36	15.67	2.44	0.15	16.27	5.47
CTEOred	<i>H. redii</i>	San Teodoro, Sardinia	1	7	7.68	351	58.3	18.45	76.74	2.77	10.07	12.84	10.41	1.24	0.09	13.28	5.53
CTEOSam	<i>H. samnitica</i>	San Teodoro, Sardinia	2	7	2.81	274	58.3	18.45	76.74	2.77	10.07	12.84	10.41	1.24	0.09	13.28	5.53
CTEUpre	<i>H. pretiosa</i>	Teulada, Sardinia	1	17	28.63	654	13.08	10.17	23.25	4.34	28.01	32.35	44.39	2.81	0.25	11.24	7.16
EANC1	<i>H. elisae</i>	Anchuelo, Spain	6	5	4.9	296	11.69	17.48	29.16	14.58	36.49	51.08	19.76	1.78	0.39	4.55	7.9
EBOA1	<i>H. elisae</i>	Boadilla del Monte, Spain	5	5	4.87	264	59.67	11.93	71.6	2.32	7.61	9.93	18.47	1.18	0.24	4.98	6.42
ECAB1	<i>H. elisae</i>	La Cabrera, Spain	3	5	1.79	220	65.46	9.28	74.75	4.3	11.62	15.92	9.34	2.15	0.51	4.18	5.68
EJAR2	<i>H. elisae</i>	Paracuellos del Jarama, Spain	4	5	3.53	259	36.01	11.48	47.49	12.36	13.69	26.06	26.45	1.82	0.34	5.31	7
ELOZ1	<i>H. elisae</i>	Lozoyuela, Spain	5	5	1.22	203	50.37	20.21	70.58	10.23	10.76	21	8.43	2	0.42	4.72	5.49
EMCNSam	<i>H. samnitica</i>	Marciana, Elba	1	8	3.38	326	45.26	13.93	59.19	5.25	26.47	31.72	9.09	2.85	0.23	12.55	6
EMOL2	<i>H. elisae</i>	El Molar, Spain	8	5	3.59	272	52.47	19.91	72.38	2.92	9.61	12.53	15.1	0.96	0.16	5.92	6.4
ENAV1	<i>H. elisae</i>	Navas de Buitrago, Spain	6	5	2.91	226	51.76	18.22	69.97	10.1	10.5	20.6	9.42	1.88	0.45	4.16	5.35
EPAR1	<i>H. elisae</i>	El Pardo, Spain	4	5	4.67	263	65.51	8.65	74.16	3.16	7.49	10.65	15.19	1.5	0.26	5.69	6.19
ERED2	<i>H. elisae</i>	Redueña, Spain	8	5	4.66	267	38.15	21.36	59.51	8.63	19.83	28.46	12.03	1.77	0.4	4.45	7.62
ESEV1	<i>H. elisae</i>	Sevilla la Nueva, Spain	5	5	5.6	272	66.19	8.22	74.41	2.93	6.58	9.52	16.08	1.28	0.2	6.46	5.93
ESIG1	<i>H. elisae</i>	Sigüero, Spain	4	5	7.44	234	44.99	10.9	55.89	10.74	18.13	28.88	15.23	2.14	0.61	3.54	5.05
ESOT2	<i>H. elisae</i>	Soto del Real, Spain	5	5	7.6	246	45.11	25.74	70.84	6.5	13.97	20.46	8.69	1.87	0.33	5.74	5.43
ETRE2	<i>H. elisae</i>	Tres Cantos, Spain	5	5	4.07	269	56.29	13.16	69.45	6.08	10.97	17.05	13.5	1.86	0.41	4.55	6.24
EUCE2	<i>H. elisae</i>	Cubillo de Uceda, Spain	6	5	3.35	283	22.94	16.53	39.47	26.2	20.14	46.34	14.19	2.3	0.48	4.83	5.57
EVEN2	<i>H. elisae</i>	Venturada, Spain	2	5	2.82	249	40.69	16.85	57.54	7.95	18.07	26.03	16.44	2.08	0.54	3.83	7.41
FONT1	<i>Hormogaster</i> spp.	Fontrubí, Spain	1	17	23.32	561	18.93	24.96	43.89	7.58	45.86	53.44	2.67	1.83	0.2	9.25	7.57

GHI2	<i>H. redii</i>	Ghilarza, Sardinia	1	7	5.21	304	11.32	10.15	21.47	12.49	39.85	52.34	26.19	5.81	1.3 7	4.24	5.6
GRA1	<i>H. eserana</i>	Graus, Spain	5	18	24.67	395	25.03	20.86	45.89	13.08	32.31	45.39	8.72	2.2	0.6 8	3.23	7.49
HEST1	<i>Hormogaster</i> spp.	L'Estany, Spain	5	15	4.48	232	5.94	15.55	21.5	6.42	68.95	75.37	3.13	0.71	0.0 8	8.87	7.95
HFLIX1	<i>H. hispanica</i>	Flix, Spain	3	13	11.32	434	3.32	44.12	47.44	11.29	39.29	50.58	1.98	0.7	0.0 7	9.32	8.4
HMOI	<i>Hormogaster</i> spp.	Moià, Spain	1	15	18.94	597	36.71	26.83	63.54	6.56	26.2	32.75	3.71	1.28	0.1 1	11.1 8	6.38
HRT4	<i>Hormogaster</i> spp.	Medinya, Spain	3	15	25.54	496	25.63	23.17	48.79	8.02	17.56	25.58	25.63	1.09	0.1	11.0 3	7.02
HRUD1	<i>H. joseantonioi</i>	Rudilla, Spain	2	9	9.31	337	23.03	8.06	31.09	5.33	60.74	66.07	2.84	2.4	0.2 4	10.1 8	7.98
HSIV1	<i>Hormogaster</i> spp.	Sant Isclè de Vallalta, Spain	1	13	24.48	581	49.6	17.23	66.83	3.75	12.74	16.48	16.68	1.34	0.0 9	14.6 2	6.06
IGELsam	<i>H. samnitica</i>	Gello, Italy	2	8	13.21	357	16.35	8.39	24.74	2.26	64	66.26	9	1.72	0.1 6	10.7 5	7.29
IGL1	<i>H. redii</i>	Iglesias, Sardinia	2	9	4.32	299	30.54	14.4	44.94	19.2	5.34	24.54	30.52	1.83	0.5 1	3.56	7.26
IGROsam	<i>H. samnitica</i>	Grosseto, Italy	1	8	15.5	350	12.79	13.33	26.12	6.4	24	30.4	43.48	2.19	0.1 7	12.8 8	7.72
LAC2	<i>He. monicae</i>	Le Cardayre, France	7	7	1.49	162	23.67	8.26	31.92	5.45	43.64	49.09	18.99	4.44	0.9 3	4.79	7.44
LARR1	<i>H. multilamella</i>	Larraga, Spain	5	21	8.26	243	5.3	23.79	29.1	10.21	56.81	67.01	3.89	1.11	0.1 3	8.75	8.14
LOP1	<i>H. huescana</i>	Loporzano, Spain	4	17	23.99	374	33.99	12.37	46.36	4.5	30.1	34.6	19.05	1.59	0.3 7	4.36	7.79
MAJ2	<i>H. sylvestris</i>	Montmajor, Spain	2	13	9.87	403	11.71	6.5	18.22	6.88	69.02	75.9	5.88	2.98	0.8 3	3.6	7.39
MND2	<i>He. monicae</i>	Mende, France	3	7	0.85	153	38.47	23.95	62.42	5.95	27.61	33.55	4.03	2.15	0.5 2	4.14	7.6
MON2	<i>H. pretiosiformis</i>	Monrepós, Spain	3	19	9.07	301	10.21	15.17	25.38	5.61	66.64	72.25	2.37	1.78	0.3 5	5.15	7.59
NPORC1	<i>Hormogaster</i> spp.	Portel des Corbières, France	1	13	14.3	383	52.84	7.3	60.15	3.45	21.33	24.77	15.08	3.14	0.2 1	14.6 6	7.7
NRIV4	<i>Hormogaster</i> spp.	Rivesaltes, France	4	13	16.42	420	36.93	20.59	57.52	6.13	17.5	23.63	18.85	1.24	0.1 1	11.7 5	7.02
OEL2	<i>H. pretiosiformis</i> <i>oroeli</i>	Peña Oroel, Spain	4	21	7.24	255	12.9	28.49	41.38	12.32	21.8	34.12	24.5	2.76	0.5 3	5.16	7.3
ORD1	<i>H. najiformis</i>	Ordal, Spain	3	17	21.05	572	19.24	9.73	28.97	9.35	32.72	42.07	28.97	3.72	0.7 6	4.91	7.38
PIG1	<i>Vygnisa vedovinii</i>	Pignans, France	b	2	3.15	361	20.21	11.09	31.31	7.78	33.55	41.33	27.36	4.26	0.8 5	5.02	7.4
PRB1	<i>H. eserana</i>	Peralba, Spain	1	18	16.53	532	15.37	15.83	31.2	6.85	59.3	66.15	2.66	3.44	0.7 1	4.87	7.42
QLL1	<i>H. nigra</i>	Quillán, France	1	13	27.36	580	11.04	11.09	22.13	3.46	72.08	75.54	2.33	1.81	0.5 2	3.52	7.62
QUE1	<i>H. castillana</i>	Puerto Querol, Spain	4	23	24.7	414	34.18	26.25	60.43	4.65	32.83	37.47	2.09	3.79	0.8 4	4.49	7.47
ROUR1	<i>Hormogaster</i> spp.	El Rourell, Spain	3	19	27.53	542	18.74	13.88	32.62	12.98	49.13	62.12	5.26	1.92	0.2 2	8.62	7.78
SAN2	<i>H. abbatisae</i>	San Joan de les Abadesses, Spain	3	15	4.22	252	13.57	9.62	23.18	6.27	32.37	38.64	38.18	4.48	1.3 2	3.39	7.09
SGF1	<i>Vygnisa popi</i>	Sant Gely du Fesc, France	3	2	2.18	325	16.68	23.62	40.3	13.19	28.82	42	17.7	2.34	0.6 7	3.48	7.55
SLINred	<i>H. redii</i>	Linguaglossa, Sicily	1	9	8.75	412	21.6	39.84	61.44	5.35	18.34	23.69	14.87	1.49	0.1 1	13.2 4	6.84
SMIQ1	<i>Hormogaster</i> spp.	Sant Miquel d'Ollerdolla, Spain	2	17	27.3	535	12.59	31	43.59	13.41	41.28	54.69	1.72	1.42	0.1 5	9.54	8.1
SSAMred	<i>H. redii</i>	Sambuca, Sicily	1	9	9.72	408	3.35	41.59	44.94	7.02	24.29	31.3	23.76	0.85	0.0 8	10.8 8	7.74
TAL1	<i>H. castillana</i>	Talarn, Spain	1	19	15.57	409	11.28	16.33	27.61	8.81	61.27	70.08	2.31	2.23	1.4 1	1.58	7.57
TES1	<i>H. samnitica</i> <i>lirapora</i>	Col de la Testa, Corsica	2	8	1.71	155	69.76	12.69	82.45	2.23	7.92	10.16	7.4	1.21	0.3 7	3.31	5.78
TOR2	<i>H. ireguana</i>	Torreccilla en Cameros, Spain	5	19	5.49	225	19.78	25.04	44.82	15.87	17.87	33.74	21.44	2.32	0.5 3	4.37	7.45
TORT1	<i>H. castillana</i>	Tortosa, Spain	2	21	42.31	524	9.76	8.52	18.27	13.04	54.61	67.65	14.07	3.04	0.3 1	9.82	7.35
VIL2	<i>Hormogaster</i> spp.	Villamassargia, Sardinia	5	11	38.33	644	26.69	18.75	45.43	3.51	24.34	27.85	26.72	1.89	0.1 4	13.5	7.22
VPJ1	<i>H. insularis</i>	Volpajola, Corsica	3	9	10.11	332	30.61	17.82	48.43	7.57	34.68	42.25	9.31	2.59	0.2 9	8.93	5.73
VVID1	<i>Hormogaster</i> spp.	Vallvidrera, Spain	1	13	22.5	536	24.59	9.44	34.03	7.07	33.7	40.77	25.2	2.38	0.2 1	11.5 8	7.94
XAN2	<i>Xana omodeoi</i>	San Román, Spain	c	12	2.4	220	9.01	5.67	14.68	1.84	22	23.84	61.48	3.34	1.2 5	2.68	5.26

**Table S4.** Population, species assignment, morphological information and soil characteristics.

## Supplementary material 5



Bayesian (left) and Maximum Likelihood (right) inference of the phylogenetic tree based on the concatenated sequence. Bootstrap/posterior probability support values over 0.9/ 0.7 are shown as red diamonds.

# **Capítulo VI- Caracteres crípticos para taxones crípticos: sobre la utilidad taxonómica de las quetas genitales en lombrices de tierra (Oligochaeta, Hormogastridae)**

## **Resumen**

Los caracteres anatómicos duros han sido usados con éxito en sistemática de invertebrados. Más allá de las quetas, este tipo de caracteres no aparece en lombrices de tierra (un grupo taxonómicamente complicado). Este trabajo explora la utilidad taxonómica de las quetas genitales, para las que se ha demostrado un papel importante en la reproducción de lombrices de tierra. Las quetas genitales se obtuvieron de diferentes clados de la familia Hormogastridae, algunos de ellos incluyendo complejos crípticos. La morfología de estas estructuras fue estudiada en detalle con microscopía electrónica de barrido y microscopía de contraste diferencial con el objetivo de encontrar información filogenética relevante a diferentes niveles: caracteres diagnósticos putativos para los clados, relaciones filogenéticas entre los clados y apoyo para la delimitación de especies crípticas. Nuestros resultados revelaron una amplia variabilidad morfológica en la punta distal de las quetas genitales entre los diferentes clados (resumida en tres caracteres cualitativos) y entre los linajes crípticos. El Análisis de Variables Canónicas basado en puntos de referencia dorsales fue capaz de separar las quetas de los linajes crípticos en clusters no solapantes y el Análisis de Función Discriminante permitió comprobar su fiabilidad. Algunas estructuras complejas en la punta de las quetas genitales, como dentículos y poros, destacaron la necesidad de más investigación sobre su papel en la reproducción de las diferentes familias de lombrices de tierra. Nuestros resultados



apoyaron el potencial de las quetas genitales como carácter sistemático para resolver relaciones filogenéticas conflictivas en lombrices de tierra, además de ser también potencialmente adecuadas para desentrañar complejos de especies crípticas.



## Research paper

## Cryptic characters for cryptic taxa: On the taxonomic utility of the genital chaetae in earthworms (Oligochaeta, Hormogastridae)



Daniel F. Marchán<sup>a,\*</sup>, Nuria Sánchez<sup>a</sup>, Marta Novo<sup>b</sup>, Rosa Fernández<sup>c</sup>, Fernando Pardos<sup>a</sup>, Darío J. Díaz Cosín<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/José Antonio Nováis 2, 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Environmental Toxicology and Biology, Facultad de Ciencias UNED, C/Senda del Rey 9, 28040, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Museum of Comparative Zoology, Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, 26 Oxford Street, Cambridge, MA, 02138, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 March 2016

Received in revised form 23 June 2016

Accepted 24 June 2016

Available online 25 June 2016

Corresponding Editor: Martin V. Sørensen.

## Keywords:

Scanning electron microscopy

Taxonomic characters

Species delimitation

Geometric morphometrics

Earthworms

Genital chaetae

## ABSTRACT

Hard anatomical characters have successfully been used in invertebrate systematics. Besides their chaetae, this kind of characters is virtually absent from earthworms (a taxonomically challenging group). This work explores the taxonomic utility of genital chaetae, which have been demonstrated to play an important role in earthworm reproduction. Genital chaetae were collected from different clades in the family Hormogastridae, some of them comprising cryptic complexes. The morphology of these structures was studied in detail with scanning electron microscopy and differential interference contrast microscopy with the aim of finding relevant phylogenetic information at different levels: putative diagnostic characters for clades, phylogenetic relationships between clades, and support for cryptic species delimitation. Our results revealed wide morphological variability in the distal tip of the genital chaetae between the different clades (summarized in five qualitative characters) and cryptic lineages. Canonical Variate Analysis based on dorsal landmarks was able to separate chaetae from the cryptic lineages in non-overlapping clusters and Discriminant Function Analysis allowed to assess its reliability. Some complex structures in the tip of genital chaetae, such as denticles and pores, highlighted the necessity of further research on their role in the reproduction of the different earthworm families. Our results support the potential of genital chaetae as a systematic character to resolve conflicting phylogenetic relationships of earthworms, being also potentially suitable for disentangling cryptic species complexes.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction

Soft-bodied invertebrates present a challenge to taxonomists: the virtual lack of hard structures hinders the reliable use of morphometric characters. To make it worse, soft bodies undergo secondary morphological changes during lifetime (regeneration, secondary growth) and changes during fixation procedures. In these cases, hard morphological characters provide an invaluable help to resolve phylogenetic relationships (Eibye-Jacobsen, 1991; Segers and Melone, 1998; Sørensen, 2002a; Sørensen, 2002b; Sørensen and Sterrer, 2002; Sørensen, 2003; San Martín and Aguado, 2012; Wulfken and Ahlrichs, 2012) including delimitation of cryptic species (Lattig et al., 2007).

Earthworms (Annelida, Oligochaeta) present the same difficulties, with many of the traditional characters used in their

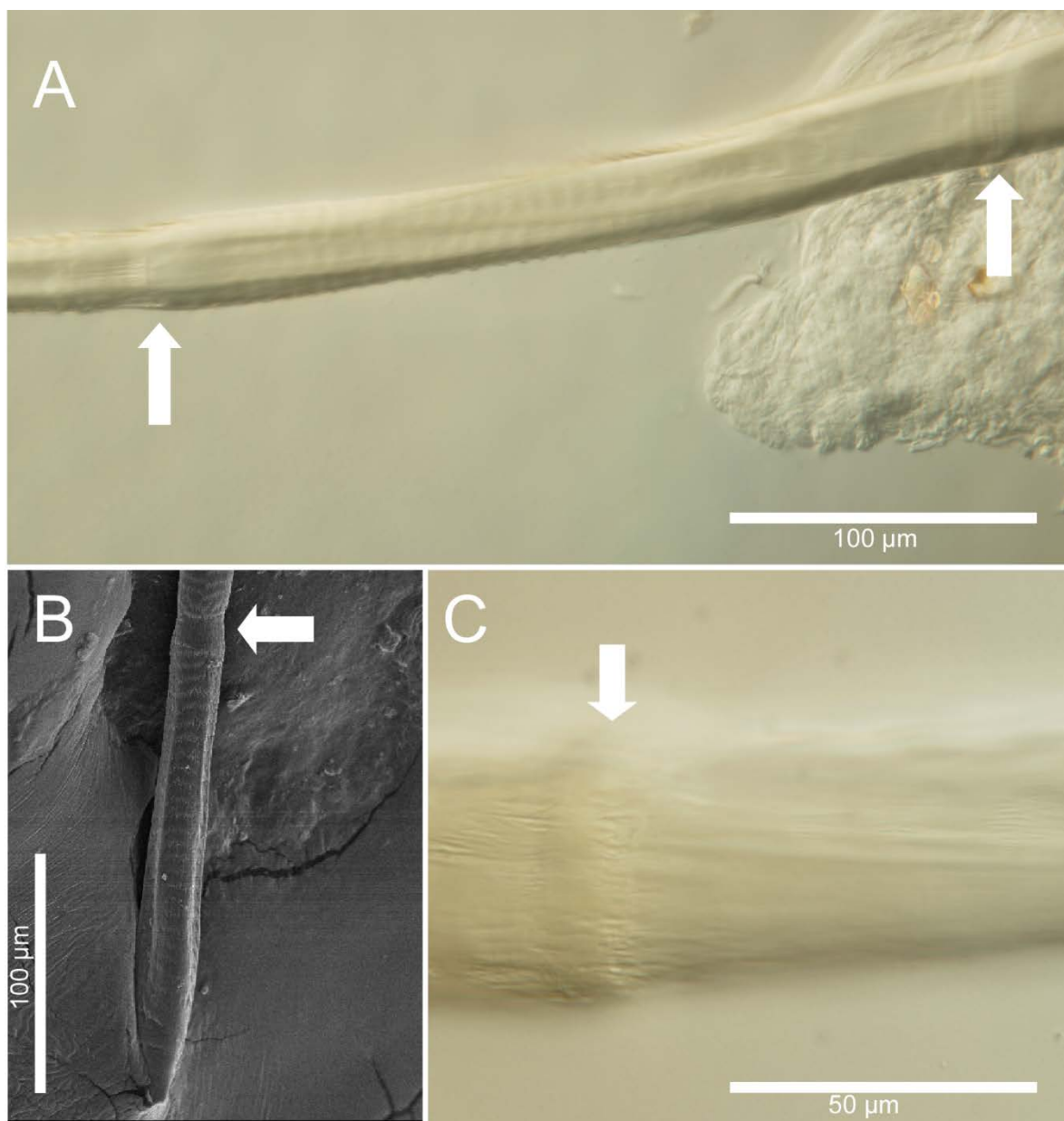
classical taxonomy showing rampant homoplasy, high plasticity and intraspecific divergence (Briones et al., 2009). The morphology of their crawling chaetae is very homogeneous across families and genera, thus they have not been considered a worthy taxonomic character. However, another set of chaetae with an inferred function in reproduction show modified shapes, considered to have taxonomic interest since the XIX century (see descriptions from Rosa, 1888). Gates (1972) classified them as follows: "...setae of follicles opening through genital tumescences are called genital. Those associated with sperm receptacles are called spermathecal or copulatory and others associated with male pores, copulatory chambers or prostates, are called penial".

The highly specialized penial chaetae of different tropical earthworm families as Megascolecidae, Acanthodrilidae, Kynotidae, Eudrilidae and Benhamiidae have received a great amount of attention from earthworm taxonomists. Lee (1959), considering them "one of the most useful specific characters", included drawings and detailed descriptions of these chaetae from all the species which presented them. Jamieson was the pioneer of the study of penial

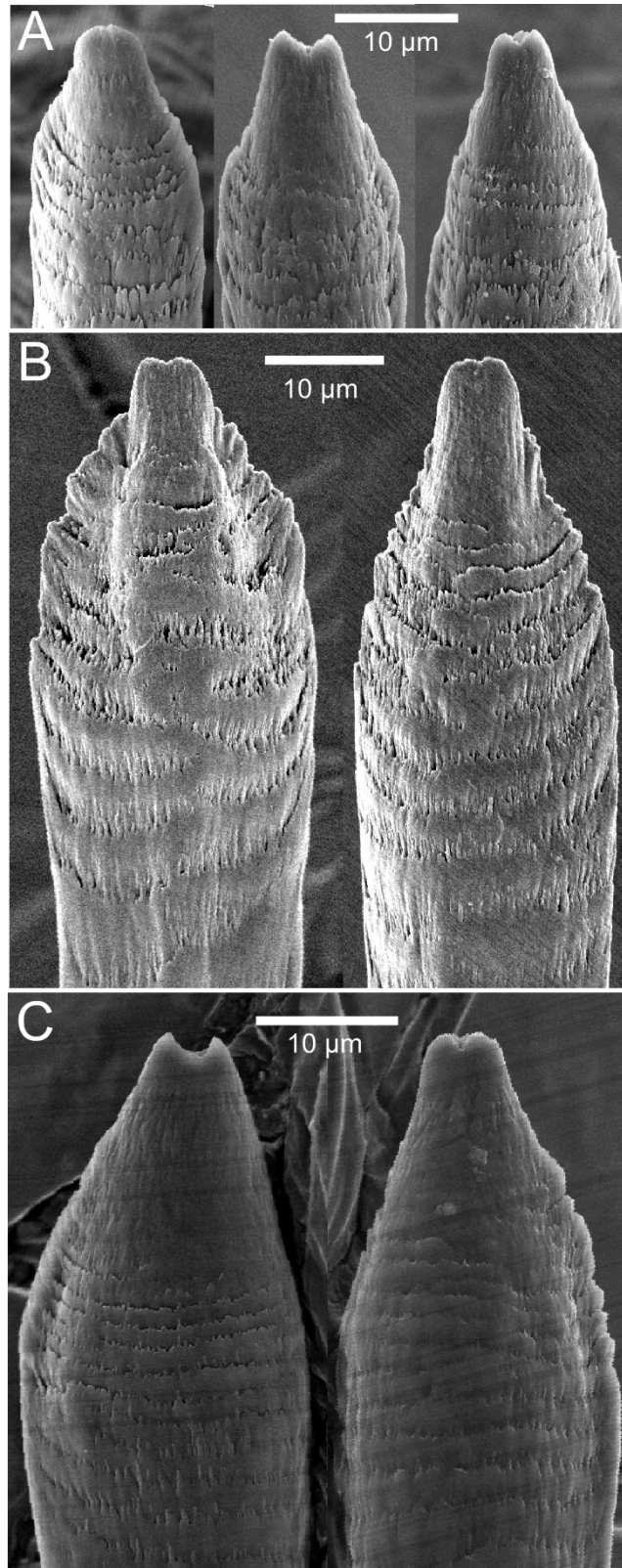
\* Corresponding author.

E-mail address: [danifermch@gmail.com](mailto:danifermch@gmail.com) (D.F. Marchán).

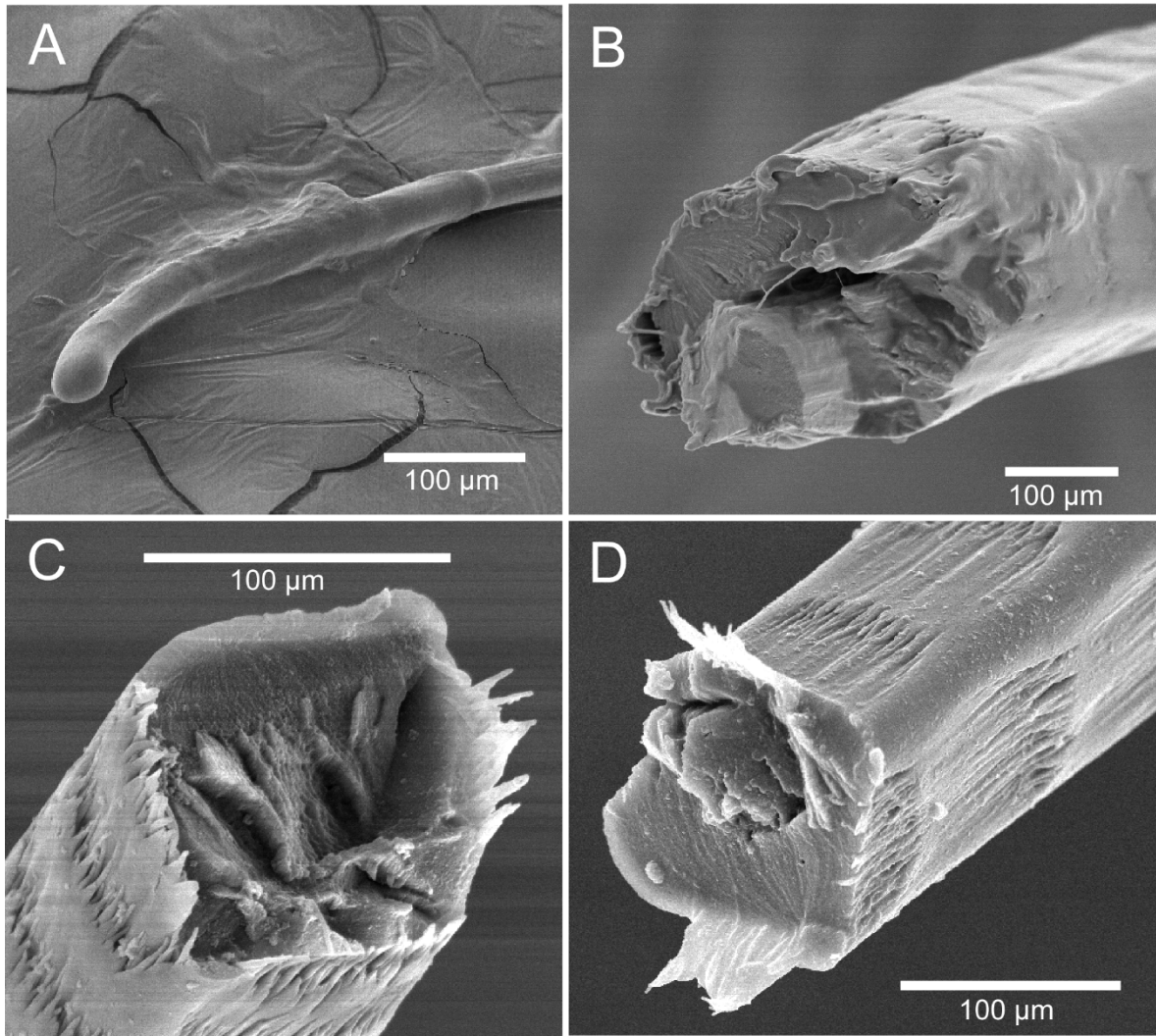
Supplementary file 1



**Figure 1.** Abrupt interruptions shown by chaetae of *H. sylvestris* a) in DIC microscopy and b) in SEM. c) The same phenomenon was observed in *H. joseantonioi* chaetae.

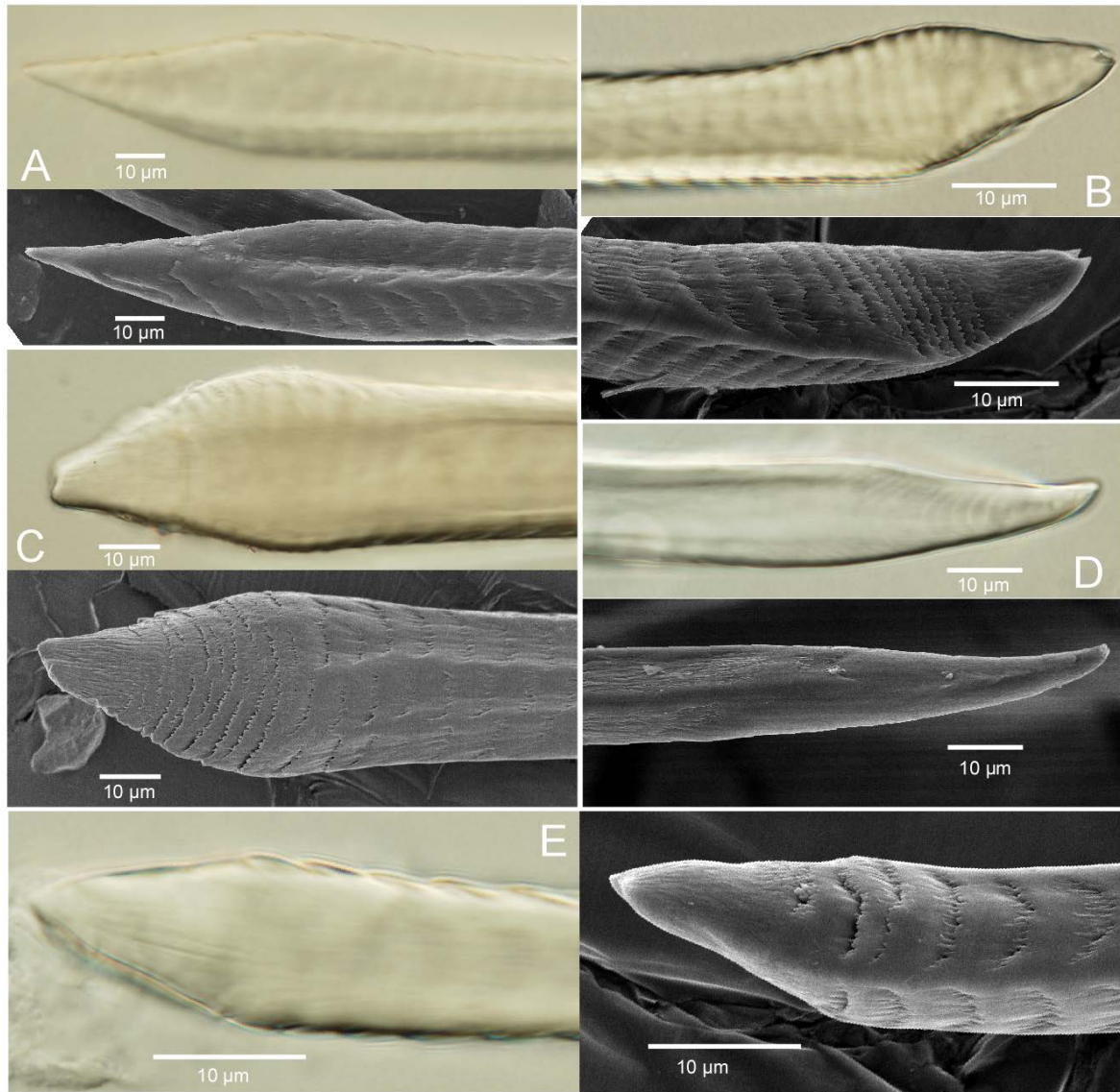


**Figure 2.** Intra-population morphological variability of the genital chaetae, attributable to different ontogenetic stages and wear of frail structures. a) *H. elisae* from Valderromán, b) *H. elisae* from Tres Cantos, c) *H. elisae* from Guadalix.



**Figure 3.** Proximal end of the genital chaetae of *H. joseantonioi* (a). Cross-sections of the genital chaetae of *H. joseantonioi* (b), *H. elisae* from Valderromán (c) and Hontoria (d).





**Figure 4.** Comparison of DIC microscopy images and SEM images of hormogastrid chaetae. A: *H. sylvestris*, B: *H. elisae* from Guadalix, C: *H. joseantonioi*, D: *H. pretiosa* from Teulada, E: *Xana omodeoi*

# **Capítulo VII- Ubicando fronteras crípticas:**

## **Filogeografía a pequeña escala y paisaje genético del complejo de especies *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae)**

### **Resumen**

Los aspectos espacio-temporales de la evolución de complejos de especies crípticas ha recibido menos atención que la delimitación de sus especies. De la filogeografía del complejo *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) se desconocen varios aspectos, incluyendo la distribución a pequeña escala de sus linajes o el contexto paleogeográfico de su diversificación. Para aclarar estos puntos, un denso muestreo fue llevado a cabo en el centro de la Península Ibérica –aportando 28 nuevas localidades de *H. elisae*, algunas tan cercanas entre sí como 760 metros- para una mayor resolución de la distribución de los linajes y las relaciones internas. Se amplificaron cuatro marcadores: COI y 16S t-RNAs, mitocondriales, y 28S rRNA e histona H3, nucleares, para inferir relaciones filogenéticas. Se usaron distintos métodos de representación de la distancia genética en COI (gráficos de heatmap y paisaje genético) para visualizar la estructuración genética. Un método anidado *sensu* Mairal *et al.* 2015 (conectando las tasas evolutivas de dos sets de datos con cobertura taxonómica diferente) se usó para obtener una filogenia calibrada basada en fósiles externos de Clitellata y un amplio set de datos moleculares. Los resultados indicaron que la limitada capacidad dispersiva activa y barreras bióticas o ecológicas podrían explicar el aislamiento de los linajes crípticos, que nunca coexisten. Eventos puntuales de dispersión a larga distancia por hidrocoria podrían ser una de las causas de expansión del área de distribución en algunos linajes.

# Pinpointing cryptic borders: Fine-scale phylogeography and genetic landscape analysis of the *Hormogaster elisae* complex (Oligochaeta, Hormogastridae)

Daniel F. Marchán<sup>a</sup>, Rosa Fernández<sup>b</sup>, Irene de Sosa<sup>a</sup>, Darío J. Díaz Cosín<sup>a</sup>, Marta Novo<sup>c</sup>

a) Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis 2, 28040, Madrid, Spain

b) Centre for Genomic Regulation, Carrer del Dr. Aiguader, 88, 08003 Barcelona, Spain

c) Environmental Toxicology and Biology, Departamento de Física Matemática y de Fluídos, Facultad de Ciencias UNED, C/ Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

Corresponding author: Daniel F. Marchán; Address: Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis 2, 28040, Madrid, Spain; E-mail: danifermch@gmail.com; Telephone number: 676852579

## Abstract

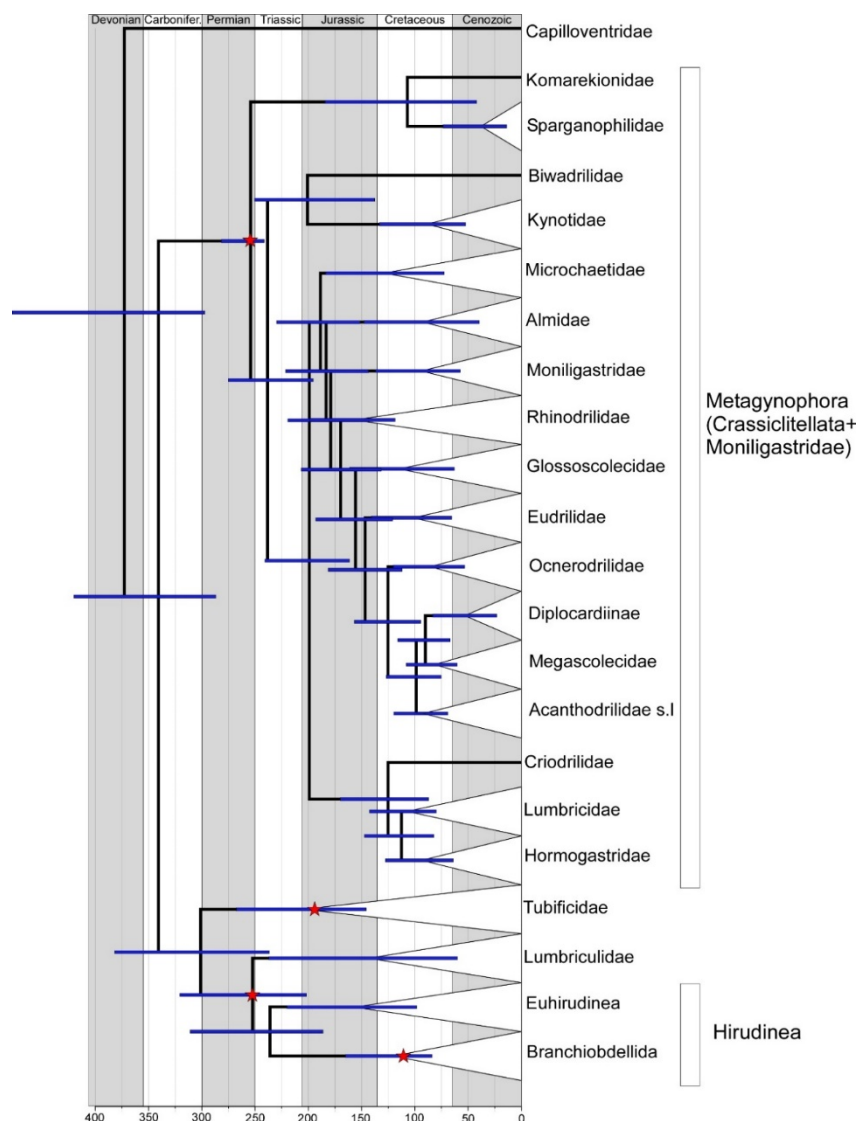
Spatial and temporal aspects of the evolution of cryptic species complexes have received less attention than species delimitation within them. The phylogeography of the cryptic complex *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) lacks knowledge on several aspects, including the small-scale distribution of its lineages or the palaeogeographic context of their diversification. To shed light on these topics, a dense specimen collection was performed in the center of the Iberian Peninsula – resulting in 28 new *H. elisae* collecting points, some of them as close as 760 meters - for a higher resolution of the distribution of the cryptic lineages and the relationships between the populations. Seven molecular regions were amplified: mitochondrial subunit 1 of cytochrome *c* oxidase (COI), 16S rRNA and tRNA Leu, Ala, and Ser (16S t-RNAs), one nuclear ribosomal gene (a fragment of 28S rRNA) and one nuclear protein-encoding gene (histone H3) in order to infer their phylogenetic relationships. Different representation methods of the pairwise divergence in the cytochrome oxidase I sequence (heatmap and genetic landscape graphs) were used to visualize the genetic structure of *H. elisae*. A nested approach *sensu* Mairal *et al.* 2015 (connecting the evolutionary rates of two datasets of different taxonomic



## Supplementary file 1

### Divergence time estimation of Clitellata and Hormogastridae datasets

The time-calibrated phylogeny of Clitellata is shown in figure 1. The inclusion of only two molecular markers, chosen for their homogeneous availability across the studied taxa, resulted in some differences from the expected topology (mainly Moniligastridae within Crassiclitellata). However, the main phylogenetic relationships within Crassiclitellata mirror the ones shown in James & Davidson 2012.



**Figure 1.** Ultrametric tree obtained from 28S and 16S sequences of the Clitellata dataset. Red stars show the points of calibration. Clades were collapsed for simplicity.

The estimated age for the root of the Clitellata -372 Ma (297-478)- is coherent with the fossil record, as the oldest crown group polychaete fossil (*Xanioprion viivei* – a fossilized jaw apparatus from Aciculata, Benton *et al.* 2015) is dated at 476 Ma.

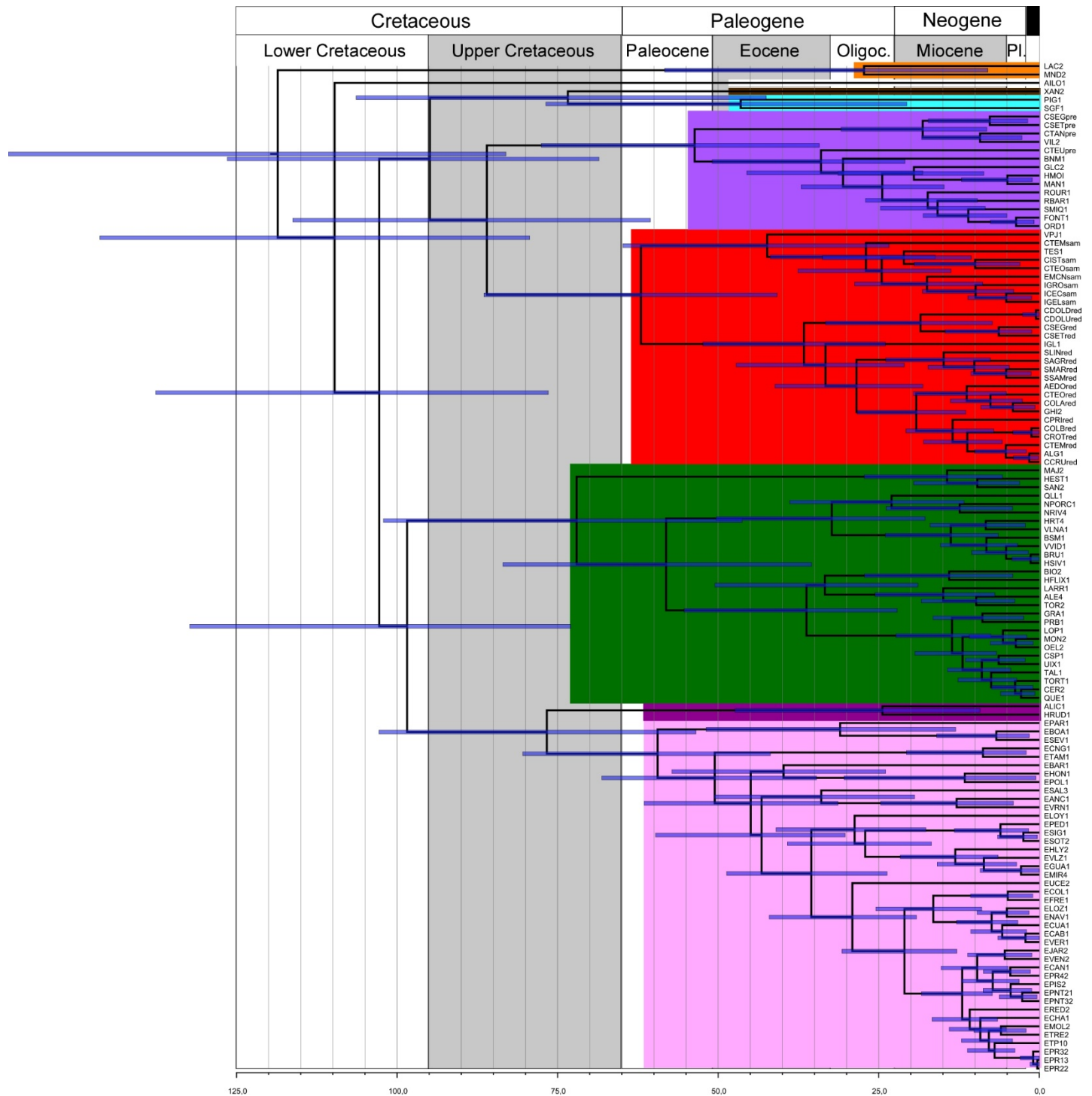
According to the analysis, Tubificidae would have diverged at 204 Ma (145-267), well before the age of their oldest fossil records (125 Ma). This is congruent with the presence of different species with diverse morphologies in the Las Hoyas Formation (Timm *et al.* 2016).

Our results show that the common ancestor of earthworms (Crassiclitellata + Metagynophora) would have lived around the Permo-Triassic boundary, when Pangea was a continuous landmass. This is a logical requisite for the current distribution of earthworms in all continents (except Antarctica). A deep split between northern hemisphere (Criodrilidae, Lumbricidae and Hormogastridae) and southern hemisphere (Microchaetidae, Almidae, Moniligastridae, Rhinodrilidae, Glossoscolecidae, Eudrilidae, Ocnerodrilidae, Megascolecidae and Acanthodrilidae) earthworm families showed an estimated age (199 Ma, 161-240) that partially overlaps with the onset of the opening of the Central Atlantic Ocean (around 190 Ma, de Lamotte *et al.* 2015). It is possible to hypothesize that the tectonic event could have been involved in the vicariance of these clades. The continuity of South American and African landmasses until 110 Ma is also coherent with the alternating split of South American and African clades before said date. Comparing the age of the clades with other previous time-calibrated earthworm phylogenies, it is interesting that the estimated age for the Criodrilidae-Lumbricidae-Hormogastridae clade (125, 87-170) is very consistent with the one obtained by Domínguez *et al.* (2015) (125, 114-137). The estimated age for Megascolecidae s.l (including Acanthodrilidae s.l and Diplocardiinae) of 98 Ma (75-126) is also similar to the date obtained by Moreau *et al.* (2015) –around 87 Ma-.

The time-calibrated phylogeny of Hormogastridae is shown in figure 2. The ages obtained for most nodes were older than the equivalent splits in the Clitellata tree. However, the 95% HPD intervals showed strong overlap. This was likely caused by the decreased sampling of genetic diversity in the first dataset, resulting in underestimation of the divergence times (Venditti *et al.* 2006, Schulte 2013).

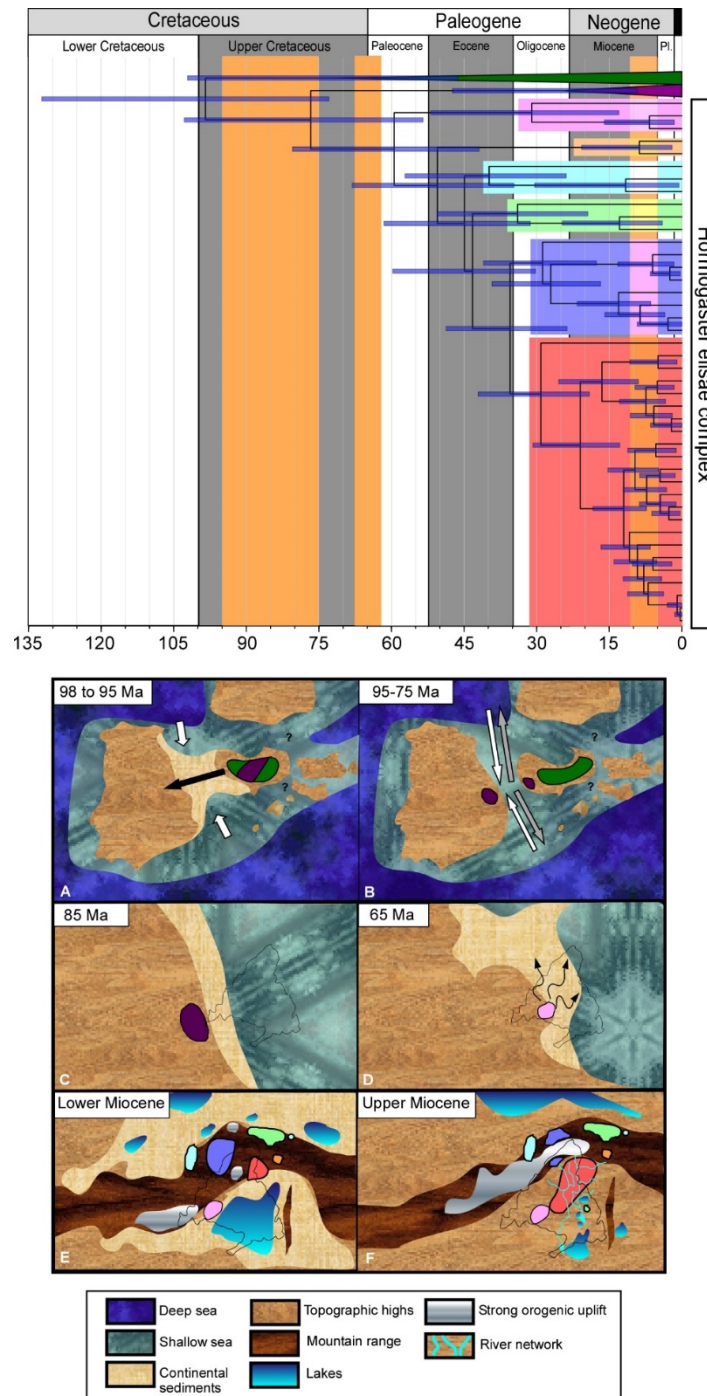
The estimated age for the root of the family Hormogastridae (118, 83-160) was significantly older than the range of values obtained by Novo *et al.* (2011) (67 to 97, from different methods), but it was closer to the age estimated by Domínguez *et al.* (2015) (115, 102-130). However, the latter included only two hormogastrid species.

Even though the width of the 95% HPD intervals makes paleobiogeographical interpretations difficult, the estimated ages show a certain degree of overlap with previous hypotheses. For example, the age of the onset of rifting between the Iberian and Corsica-Sardinia microplates (33 Ma, Schettino & Turco 2006) was considered by Novo *et al.* (2011) as a calibration point for the vicariance of the Iberian and Sardinian species of the Disjunct clade. In our time-calibrated phylogeny, the divergence between CTEUpre (*Hormogaster pretiosa* s.l from Teulada, Sardinia) and the Iberian representatives (*Hormogaster regina* –BNM1-, *Hormogaster najaformis* –ORD1- and other undescribed species) was estimated at 34 Ma (21-50). Even taking into account the wide interval, the youngest estimate precedes the start of oceanic spreading (20.5 Ma, Gattacceca *et al.* 2007), and the oldest estimate leave room for ancient divergence before the tectonic event.



**Figure 2.** Ultrametric tree obtained from 28S and 16S sequences of the Hormogastridae dataset. Coloured squares represent the main hormogastrid clades: orange - Hemigastrodrilus, white – Ailoscolex, brown – Xana, light blue – Vignysa, purple- Disjunct clade, red – Tyrrhenian clade, green – Northeastern Iberia clade, maroon – *Hormogaster joseantonioi* clade, pink – Central Iberia clade.

One of the palaeogeographic settings compatible with the estimated diversification ages of *H. elisae* and their closest relatives is shown in figure 4.



**Figure 3.** Section of the time-calibrated ultrametric tree of the Hormogastridae dataset featuring the divergence of the Northeastern Iberian (green), *H. joseantonioi* (purple) and Central Iberia (*H. elisae* complex, multiple colors: Red: lineage I, dark blue: lineage II, green: lineage III, light blue: lineage IV, orange: lineage V, pink: lineage VI) clades of the family Hormogastridae. 95% HPD intervals are shown as blue bars. Vertical orange bars bracket relevant palaeogeographic intervals. Right figures show reconstructions of said periods: A) Continental deposits as an emerged land bridge between Western and Eastern Iberia at 98-95 Ma, followed by B) repeated transgressive-regressive cycles until 75 Ma C) Central Iberia, with present day Madrid (whose borders appear outlined) completely covered by the sea D) Retreat of the sea towards the east at around 65 Ma E) Configuration of the topography of the Madrid Basin in the Lower Miocene (endorheic basin) F) and Upper Miocene (exorheic basin), with strong mountain uplift and development of a north-south fluvial system. Modified from Alonso *et al.* (1994), de Vicente *et al.* (2007), Advokaat *et al.* (2014) and de Vicente & Muñoz-Martín (2013).

## References

- Frizon de Lamotte D, Fourdan B, Leleu S, Leparmentier F, Clarens P (2015) Style of rifting and the stages of Pangea breakup. *Tectonics*, **34**(5), 1009-1029.
- Gattacceca J, Deino A, Rizzo R, Jones DS, Henry B, Beaudoin B, Vadeboin F (2007) Miocene rotation of Sardinia: new paleomagnetic and geochronological constraints and geodynamic implications. *Earth and Planetary Science Letters*, **258**(3), 359-377.
- Moreau CS, Hugall AF, McDonald KR, Jamieson BG, Moritz C (2015) An ancient divide in a contiguous rainforest: endemic earthworms in the Australian Wet Tropics. *PloS one*, **10**(9), e0136943.
- Schettino A, Turco E (2006) Plate kinematics of the western Mediterranean region during the Oligocene and early Miocene. *Geophys. J. Int.* **166**, 1398–1423
- Schulte JA (2013) Undersampling taxa will underestimate molecular divergence dates: an example from the South American lizard clade Liolaemini. *International journal of evolutionary biology*, 2013.
- Venditti C, Meade A, Pagel M (2006) Detecting the node-density artifact in phylogeny reconstruction. *Systematic Biology*, **55**(4), 637-643.

## Supplementary file 2

### Crossbreeding experiment between populations of lineage I and II

Fifty-seven and seventy-four immature specimens (no signs of *tubercular pubertatis* or clitellum) of *H. elisae* lineage II (population Miraflores) and I (population El Molar) were collected at different times from 3/05/2012 to 4/03/2013 and kept in separate microcosms following the conditions and procedure of Díaz Cosín *et al.* (2009) and Novo *et al.* (2013). At first, individuals from each population were kept in soil from their locality, but after observation of high death rates and slow growth of lineage II specimens all microcosms were prepared with soil from lineage I locality: the earthworms adapted well to the new soil and showed more consistent growth.

During the growth phase 36 (lineage II) and 45 (lineage I) individuals perished. This means both populations suffered very similar death rates of around 60%.

When eight earthworms from each lineage reached maturity (shown by the clear development of the clitellum) they were tagged with differently coloured visual implant elastomer (VIE) and placed in mating pairs of two different lineages; as *H. elisae* prefers to mate with specimens of similar body weight (Novo 2010) mating pairs were chosen following this criterion. Mating pairs were kept together for fifteen days: This interval was purposefully longer than the one in Novo *et al.* (2013) to account for the possible delay in mating by genetically isolated individuals. After that time the mating partners were separated and kept in microcosms consisting of PVC cylinders of 10.5 cm diameter and 30 cm depth filled with 2400g of moisturized soil from El Molar (20% humidity and 16 °C); under the same conditions earthworms from El Molar were able to lay cocoons successfully (Novo *et al.* 2013). Earthworms were kept in this conditions for 7 months, from 26/05/2016 to 20/12/2016.

After this period, only two earthworms (from different mating pairs) laid cocoons: one lineage II earthworm laid 1 cocoons and one lineage I earthworm laid 2 cocoons. Lineage II cocoon and one of lineage I cocoons showed a clear content with no sign of embryos inside, thus were considered inviable. One embryo developed within the third cocoon, but it died before eclosion.

To obtain more information about mating between the pairs, all individuals were fixed in ethanol 96° and dissected for study of their spermathecae. Individuals that laid cocoons showed iridescent spermathecae (evidence of sperm storage), but their mating partners did not. Conversely, two other earthworms showed iridescent spermathecae but they did not lay cocoons; in this case their mating partners did not show iridescent spermathecae either.

The low number of individuals laying cocoons and produced cocoons, and the lack of viable cocoons (compare to Novo *et al.* 2013) suggest a high degree of reproductive isolation between the studied representatives of lineages I and II. The low number of successful matings (suggested by the individuals with sperm transfer) suggests pre-mating isolation, while the low cocoon production and viability suggest post-copula isolation. Interestingly, in successful matings only one of the partners kept sperm in their spermathecae: this could be explained by one of the partners avoiding sperm uptake or by digestion of the transferred sperm within the spermathecae (Novo *et al.* 2012)

While this experiment suffered some many pitfalls (low number of mating pairs, monitoring period after mating pairs separation was relatively short) these results provide convincing preliminary evidence of the evolution of reproductive isolation between both cryptic lineages, supporting their status as biological species.



Díaz Cosín DJ, Hernández P, Trigo D, Fernández R, Novo M (2009). Algunos aspectos del ciclo biológico del endemismo ibérico, *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 (Oligochaeta, Hormogastridae), en cultivos de laboratorio. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural Sección Biológica*, **103**, 49-57.

Novo, M., Riesgo, A., Roldán, C., Giribet, G., Díaz Cosín, D. J. (2012). A place for nourishment or a slaughterhouse? Elucidating the role of spermathecae in the terrestrial annelid *Hormogaster elisae* (Clitellata: Opisthopora: Hormogastridae). *Zoomorphology*, **131**(2), 171-184.

Novo M, Fernández R, Granado-Yela C, López MG, Díaz Cosín DJ (2013). Does the order of copulation matter? Experimental paternity analyses in the earthworm *Hormogaster elisae* (Annelida: Hormogastridae). *Pedobiologia*, **56**(2), 97-104.

Population	Code	COI	16S	tRNAs	28s	H3	Long.	Lat.
Barcones	BAR	KX437774-78	KX437887-88	KX437928-29	KX437968-69	KX438016-17	- 2.8683	41.298 3
Cantoblanco	CAN	KX437779-82	KX437889-90	KX437930-31	KX437970-71	KX438018-19	- 3.6844	40.542 2
El Chaparral	CHA	KX437783-86	KX437891-92	KX437932-33	KX437972-73	-	- 3.6492	40.822 2
Congostrina	CNG	KX437787-91	KX437893-94	KX437934-35	KX437974-75	KX438020	- 2.9928	41.025
Las Colinas	COL	KX437792-95	KX437895-96	KX437936	KX437976-77	KX438021-22	- 3.4367	40.709 7
El Cuadrón	CUA	KX437796-98	KX437897-98	KX437937-38	KX437978-79	KX438023-24	- 3.6447	40.944 4
Frontier 1	F1	KX437799-804	KX437899-904	KX437939-44	KX437980-85	KY234348-53	- 3.7175	40.946 5
Guadalix	GUA	KX437805-13	KX437905-06	KX437945-46	KX437986-87	KX438025-26	- 3.7081	40.790 3
Monte Holiday	HLY	KX437814-16	KX437907	KX437947	KX437988	KX438027	- 3.7303	40.949 2
Hontoria	HON	KX437817-19	-	-	KX437989-90	KX438028-29	- 4.1331	40.892 8
Lozoya	LOY	KX437820	KX437908	KX437948	KX437991	KX438030	- 3.7631	40.949 2
Miraflores	MIR	KX437817	KX437909	KX437949-50	KX437992-93	KX438031-32	- 3.7461	40.793 1
Pedraza	PED	KX437826-27	KX437910	KX437951	KX437994	KX438033	- 3.8128	41.100 8
Pisics	PIS	KX437828-32	KX437911	KX437952	KX437995	KX438034	- 3.6906	40.801 7
Punto 2	PNT 2	KX437833-34	KX437912	KX437953	KX437996	KX438035	- 3.7028	40.795 3
Punto 3	PNT 3	KX437835-38	KX437913	KX437954	KX437997	KX438036	- 3.6997	40.797 2
Cabañas de Polendos	POL	KX437839-43	KX437914	-	KX437998-99	KX438037-38	-4.1	41.052 2
Pardo1	PR1	KX437844-46	KX437915	KX437955	KX438000	KX438039	- 3.7622	40.518 9
Pardo2	PR2	KX437847-48	KX437916	KX437956	KX438001	KX438040	- 3.7514	40.517 5
Pardo3	PR3	KX437849-51	KX437917	KX437957	KX438002	KX438041	- 3.7347	40.519 4
Pardo4	PR4	KX437852	KX437918	KX437958	KX438003	KX438042	- 3.7111	40.533 1
Saldaña de Ayllón	SAL	KX437853	KX437919	KX437959	KX438004	KX438043	- 3.4283	41.386 4
Tamajón	TAM	KX437854-58	KX437920	KX437960	KX438005-06	KX438044-45	- 3.2531	40.966 1
Tomillar B	TB	KX437859-66	KX437921-22	KX437961-62	KX438007-08	KY234354-61	- 3.7103	40.950 7
Tapia El Pardo	TP	KX437867-74	KX437923	KX437963	KX438009	KX438046	- 3.7714	40.6
El Verdugal	VER	KX437875-77	KX437924	KX437964	KX438010-11	KX438047-48	- 3.6947	40.948 1
Valdesaz	VLZ	KX437878-81	KX437925	KX437965	KX438012-13	KX438049-50	- 3.7622	41.236 4
Valderromán	VRN	KX437882-86	KX437926-27	KX437966-67	KX438014-15	KX438051-52	- 3.1192	41.364 4

**Table S1.** *Hormogaster elisae* populations sequenced for this work, Genbank accession numbers for each of the molecular markers and geographic coordinates. Long.: Longitude. Lat: Latitude.

Major taxa	Family/subfamily	Species	Code	16s	28s
Metagynophora	Acanthodrilidae	<i>Acanthodrilidae</i> sp. MG	-	JF267870	HQ728986
Metagynophora	Acanthodrilidae	<i>Diplostroma</i> sp. 904	-	JF267871	HQ728987
Metagynophora	Almidae	<i>Almidae</i> sp. Ke	-	JF267921	HQ728997
Metagynophora	Almidae	<i>Glyphidrilus</i> sp. SUT	-	JF267919	HQ728961
Metagynophora	Benhaminae	<i>Benhamia</i> sp. Gh	-	JF267873	HQ728992
Metagynophora	Benhaminae	<i>Dichogaster saliens</i>	-	JF267867	HQ728988
Metagynophora	Benhaminae	<i>Dichogaster</i> sp. DomMM	-	JF267865	HQ728990
Metagynophora	Benhaminae	<i>Dichogaster</i> sp. FJ22	-	JF267864	HQ728984
Metagynophora	Benhaminae	<i>Dichogaster</i> sp. Ga5_2	-	JF267876	HQ728994
Metagynophora	Benhaminae	<i>Dichogaster</i> sp. Ke	-	JF267875	HQ728989
Metagynophora	Benhaminae	<i>Millsonia</i> sp. Gh	-	JF267874	HQ728993
Metagynophora	Biwadrilidae	<i>Biwadrilus bathybatas</i>	-	JF267906	HQ728949
Metagynophora	Diplocardiinae	<i>Diplocardia conoyeri</i>	-	JF267868	HQ728983
Metagynophora	Diplocardiinae	<i>Neotrigaster rufa</i>	-	JF267866	HQ728982
Metagynophora	Eudrilidae	<i>Eudriloides</i> sp. Ke	-	JF267879	HQ728959
Metagynophora	Eudrilidae	<i>Hyperiodrilus</i> sp. Gh	-	JF267877	HQ728960
Metagynophora	Eudrilidae	<i>Polytoreutus finni</i>	-	JF267878	HQ728958
Metagynophora	Glossoscolecidae	<i>Fimoscolex</i> sp. PG	-	JF267885	HQ728966
Metagynophora	Glossoscolecidae	<i>Glossodrilus</i> sp. 862	-	JF267889	HQ728968
Metagynophora	Glossoscolecidae	<i>Glossoscolex paulistus</i>	-	JF267888	HQ728967
Metagynophora	Komarekionidae	<i>Komarekiona eatoni</i>	-	JF267913	HQ728944
Metagynophora	Kynotidae	<i>Kynotus</i> sp. lgW	-	JF267911	HQ728946
Metagynophora	Kynotidae	<i>Kynotus</i> sp. r2	-	JF267912	HQ728948
Metagynophora	Kynotidae	<i>Kynotus</i> sp. w	-	JF267910	HQ728945
Metagynophora	Megascolecidae	<i>Archipheretima pandanophila</i>	-	JF267894	HQ728975
Metagynophora	Megascolecidae	<i>Arctiostrotus</i> sp. 389	-	JF267895	HQ728979
Metagynophora	Megascolecidae	<i>Driloleirus</i> sp. 917	-	JF267898	HQ728980
Metagynophora	Megascolecidae	<i>Pheretima</i> sp. 092_1	-	JF267927	HQ728976
Metagynophora	Megascolecidae	<i>Pontodrilus litoralis</i>	-	AY365462	AY101576
Metagynophora	Megascolecidae	<i>Terrisswalkerius</i> sp. 903	-	JF267897	HQ728974
Metagynophora	Microchaetidae	<i>Geogenia pandoana</i>	-	JF267901	HQ729000
Metagynophora	Microchaetidae	<i>Proandricus thornvillensis</i>	-	JF267881	HQ728996
Metagynophora	Microchaetidae	<i>Tritogenia lunata</i>	-	JF267880	HQ728950
Metagynophora	Moniligastridae	<i>Drawida</i> sp. bl	-	JF267916	HQ728964
Metagynophora	Moniligastridae	<i>Drawida</i> sp. br	-	JF267918	HQ728963
Metagynophora	Moniligastridae	<i>Drawida</i> sp. w	-	JF267917	HQ728962
Metagynophora	Ocnerodrilidae	<i>Gordiodrilus elegans</i>	-	JF267902	HQ728973
Metagynophora	Ocnerodrilidae	<i>Kerriona</i> sp. 343	-	JF267904	HQ728970
Metagynophora	Ocnerodrilidae	<i>Nematogenia</i> sp. 341	-	JF267903	HQ728971
Metagynophora	Ocnerodrilidae	<i>Ocnerodrilidae</i> sp. PR	-	JF267905	HQ728969
Metagynophora	Rhinodrilidae	<i>Andiorrhinus</i> sp. PG	-	JF267884	HQ728953
Metagynophora	Rhinodrilidae	<i>Atatina</i> sp. B1	-	JF267890	HQ728957
Metagynophora	Rhinodrilidae	<i>Estherella</i> sp. EY2	-	JF267882	HQ728951
Metagynophora	Rhinodrilidae	<i>Pontoscolex spiralis</i>	-	JF267883	HQ728954

Metagynophora	Rhinodrilidae	<i>Urobenus brasiliensis</i>	-	JF267886	HQ728955
Metagynophora	Sparganophilidae	<i>Sparganophilus sp. G1</i>	-	JF267907	HQ728942
Metagynophora	Sparganophilidae	<i>Sparganophilus sp. L</i>	-	JF267915	HQ728998
Metagynophora	Criodrilidae	<i>Criodrilus lacuum</i>	-	KJ912604	KJ912254
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Allolobophora chaetophora</i>	-	KJ912565	KJ912210
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Allolobophora chlorotica</i>	-	KJ912505	KJ912149
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Allolobophora dacica</i>	-	KJ912504	-
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Allolobophora molleri</i>	-	KJ912515	KJ912156
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Allolobophoridella eiseni</i>	-	KJ912508	KJ912151
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Aporrectodea georgii</i>	-	KJ912511	-
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Aporrectodea jassiensis</i>	-	KJ912510	KJ912153
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Aporrectodea limicola</i>	-	FJ967636	FJ967505
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Aporrectodea longa</i>	-	FJ967604	FJ967472
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Aporrectodea nocturna</i>	-	FJ967629	FJ967498
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Aporrectodea rosea</i>	-	KJ912516	KJ912157
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Aporrectodea trapezoides</i>	-	FJ967600	FJ967468
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Aporrectodea tuberculata</i>	-	FJ967643	FJ967512
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Bimastos zeteki</i>	-	KJ912521	HQ728940
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Cataladrilus monticola</i>	-	JN872095	JN871949
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Cernosvitovia bertae</i>	-	JN872088	JN871942
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Dendrobaena byblica</i>	-	KJ912523	KJ912166
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Dendrobaena illyrica</i>	-	KJ912524	KJ912168
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Dendrobaena octaedra</i>	-	KJ912532	KJ912177
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Dendrobaena pygmaea</i>	-	KJ912531	KJ912175
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Dendrodrilus rubidus</i>	-	KJ912536	KJ912183
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Diporodrilus pilosus</i>	-	KJ912542	KJ912189
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Eisenia andrei</i>	-	KJ912543	KJ912190
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Eisenia balatonica</i>	-	KJ912544	KJ912191
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Eisenia fetida</i>	-	KJ912545	KJ912192
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Eiseniella tetraedra</i>	-	KJ912552	KJ912198
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Eiseniona albolineata</i>	-	KJ912554	KJ912200
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Eisenoides carolinensis</i>	-	KJ912556	KJ912201
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Eophyla cyanea</i>	-	Unpublished	Unpublished
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Fitzingeria platyura</i>	-	KJ912559	KJ912204
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Helodrilus cernosvitovianus</i>	-	KJ912562	KJ912207
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Helodrilus cortezi</i>	-	KJ912563	KJ912208
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Lumbricus castaneus</i>	-	KJ912566	KJ912212
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Octodrilus complanatus</i>	-	KJ912577	KJ912225
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Octodrilus transpadanus</i>	-	KJ912576	KJ912224
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Octolasion lacteum</i>	-	KJ912581	KJ912228
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Panoniona leoni</i>	-	KJ912584	-
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Postandrilus majorcanus</i>	-	JN872067	JN871925
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Proctodrilus antipai</i>	-	KJ912585	KJ912231
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Proselodrilus pyrenaicus</i>	-	JN872097	JN871952
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Scherotheca corsicana</i>	-	KJ912587	KJ912234

Metagynophora	Lumbricidae	<i>Scherotheca gigas</i>	-	KJ912592	KJ912239
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Scherotheca savignyi</i>	-	KJ912599	KJ912247
Metagynophora	Lumbricidae	<i>Serbiona mehadensis</i>	-	KJ912506	KJ912203
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Ailoscolex lacteospumousus</i>	AILO1	KP944202	KP944204
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. insularis</i>	VPJ1	HQ621890	HQ621967
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. abbatissae</i>	SAN2	HQ621884	HQ621961
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. arenicola</i>	BIO2	HQ621865	HQ621943
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. castillana</i>	QUE1	HQ621883	HQ621960
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. catalaunensis</i>	BRU1	HQ621866	HQ621944
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. elisae</i>	EMOL2	GQ409732	GQ409653
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. elisae</i>	EPAR1	HQ621879	GQ409655
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. elisae</i>	ESIG1	GQ409710	GQ409654
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. eserana</i>	GRA1	HQ621870	HQ621948
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. gallica</i>	BSM1	HQ621867	HQ621945
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. hispanica</i>	HFLIX1	KT246401	KT246426
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. huescana</i>	LOP1	HQ621873	HQ621951
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. ireguana</i>	TOR2	HQ621888	HQ621965
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. joseantonioi</i>	HRUD1	KJ632684	KJ632686
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. multilamella</i>	LARR1	KT246406	KT246431
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. najaformis</i>	ORD1	HQ621878	HQ621956
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. nigra</i>	QLL1	HQ621882	HQ621959
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. pretiosa</i>	CTEUpred	KF975137	KF975285
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. pretiosiformis</i>	MON2	HQ621876	HQ621954
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. redii</i>	ALG1	HQ621863	HQ621942
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. redii</i>	COLBred	KF975042	KF975264
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. redii</i>	CSEGpred	KF975063	KF975269
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. redii</i>	CSEGrred	KF975067	KF975270
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. redii</i>	GHI2	HQ621869	HQ621947
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. redii</i>	IGL1	HQ621871	HQ621949
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. redii</i>	SLINred	KF975163	KF975297
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. samnitica</i>	CTEMsam	KF975095	KF975277
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. samnitica</i>	CTEOsam	KF975116	KF975281
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. samnitica</i>	EMCNsam	KF975146	KF975287
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. samnitica</i>	IGROsam	KF975154	KF975293
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. samnitica lirapora</i>	TES1	HQ621887	HQ621964
Metagynophora	Hormogastridae	<i>H. sylvestris</i>	MAJ2	HQ621874	HQ621952
Metagynophora	Hormogastridae	<i>He. monicae</i>	MND2	HQ621875	HQ621953
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hemigastrodrilus monicae</i>	LAC2	HQ621872	HQ621950
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hormogaster pretiosa</i>	VIL2	HQ621893	HQ621969
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hormogaster regina</i>	BNM1	KU523582	Unpublished
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hormogaster riojana</i>	ALE4	HQ621862	HQ621941
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hormogaster spp.</i>	HEST1	KT246399	KT246424
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hormogaster spp.</i>	HMOI	KT246402	KT246427
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hormogaster spp.</i>	NRIV4	KT246409	KT246434
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hormogaster spp.</i>	RBAR1	Unpublished	Unpublished

Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hormogaster spp.</i>	ROUR1	KT246411	KT246436
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Hormogaster spp.</i>	VLNA1	KT246417	KT246442
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Vygnisa popi</i>	SGF1	HQ621885	HQ621962
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Vygnisa vedovinii</i>	PIG1	HQ621880	HQ621957
Metagynophora	Hormogastridae	<i>Xana omodeoi</i>	XAN2	HQ621891	HQ621968
Clitellata	Capilloventridae	<i>Capilloventer australis</i>	-	AY340448	AY340384
Clitellata	Lumbriculidae	<i>Eremidrilus coyote</i>	-	JQ821462	JQ821580
Clitellata	Lumbriculidae	<i>Lumbriculus cf. variegatus</i>	-	JQ821463	JQ821581
Branchiobdellida	Bdellodrilinae	<i>Bdellodrilus illuminatus</i>	-	JQ821459	JQ821577
Branchiobdellida	Bdellodrilinae	<i>Cronodrilus ogygius</i>	-	JQ821438	JQ821556
Branchiobdellida	Bdellodrilinae	<i>Uglukodrilus hemophagus</i>	-	JQ821453	JQ821571
Branchiobdellida	Branchiobdellinae	<i>Ankyrodrilus koronaeus FC</i>	-	JQ821409	JQ821527
Branchiobdellida	Branchiobdellinae	<i>Ankyrodrilus koronaeus IC</i>	-	JQ821411	JQ821529
Branchiobdellida	Branchiobdellinae	<i>Ankyrodrilus legaeus FC</i>	-	JQ821410	JQ821528
Branchiobdellida	Branchiobdellinae	<i>Ankyrodrilus legaeus IC</i>	-	JQ821412	JQ821530
Branchiobdellida	Branchiobdellinae	<i>Xironogiton instabilis</i>	-	JQ821455	JQ821573
Branchiobdellida	Branchiobdellinae	<i>Xironogiton kittitisi</i>	-	JQ821457	JQ821575
Branchiobdellida	Branchiobdellinae	<i>Xironogiton occidentalis</i>	-	JQ821458	JQ821576
Branchiobdellida	Branchiobdellinae	<i>Xironogiton victoriensis</i>	-	JQ821456	JQ821574
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola bobbi</i>	-	JQ821459	JQ821577
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola chirocephalus</i>	-	JQ821445	JQ821563
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola fallax</i>	-	JQ821428	JQ821546
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola floridanus</i>	-	JQ821446	JQ821564
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola gracilis</i>	-	JQ821442	JQ821560
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola heterognathus</i>	-	JQ821414	JQ821532
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola holostomus</i>	-	JQ821450	JQ821568
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola holti</i>	-	JQ821465	JQ821583
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola ingens</i>	-	JQ821448	JQ821566
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola macrodontus</i>	-	JQ821451	JQ821569
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola mesochoreus</i>	-	JQ821443	JQ821561
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola meyeri</i>	-	JQ821444	JQ821562
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola okadai</i>	-	JQ821426	JQ821544
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola osceola</i>	-	JQ821420	JQ821538
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola pamela</i>	-	JQ821441	JQ821559
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola philadelphicus 1</i>	-	JQ821452	JQ821570
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola philadelphicus 2</i>	-	JQ821466	JQ821584
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola philadelphicus 3</i>	-	JQ821429	JQ821547
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola philadelphicus 4</i>	-	JQ821427	JQ821545
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola serratus</i>	-	JQ821419	JQ821537
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola shoshone</i>	-	JQ821416	JQ821534
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola sp.</i>	-	JQ821622	JQ821447
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Cambarincola vitreus</i>	-	JQ821440	JQ821558
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Ceratodrilus ophiorhysis</i>	-	JQ821424	JQ821542
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Magmatodrilus obscurus</i>	-	JQ821425	JQ821543
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Oedipodrilus anisognathus</i>	-	JQ821449	JQ821567

Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Oedipodrilus macbaini</i>	-	JQ821430	JQ821548
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Pterodrilus alcicornus</i>	-	JQ821431	JQ821549
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Pterodrilus cedrus</i>	-	JQ821434	JQ821552
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Pterodrilus choritonamus</i>	-	JQ821433	JQ821551
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Pterodrilus distichus</i>	-	JQ821436	JQ821554
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Pterodrilus hobbsi 1</i>	-	JQ821437	JQ821555
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Pterodrilus hobbsi 2</i>	-	JQ821432	JQ821550
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Pterodrilus robiniae</i>	-	JQ821435	JQ821553
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Sathodrilus attenuatus</i>	-	JQ821417	JQ821535
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Sathodrilus chehalisae</i>	-	JQ821421	JQ821539
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Sathodrilus inversus 1</i>	-	JQ821423	JQ821541
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Sathodrilus inversus 2</i>	-	JQ821415	JQ821533
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Sathodrilus lobatus</i>	-	JQ821422	JQ821540
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Sathodrilus norbyi</i>	-	JQ821418	JQ821536
Branchiobdellida	Cambarincolinae	<i>Triannulata magna</i>	-	JQ821454	JQ821572
Branchiobdellida	Xironodrilinae	<i>Xironodrilus appalachius</i>	-	JQ821408	JQ821526
Branchiobdellida	Xironodrilinae	<i>Xironodrilus formosus</i>	-	JQ821413	JQ821531
Euhirudinea	Erpobdellidae	<i>Erpobdella obscura</i>	-	JQ821464	JQ821582
Euhirudinea	Glossiphonidae	<i>Glossiphonia complanata</i>	-	JQ821460	JQ821578
Euhirudinea	Glossiphonidae	<i>Helobdella stagnalis</i>	-	JQ821461	JQ821579
Tubificidae/Naididae	Limnodriloidinae	<i>Limnodriloides anxius</i>	-	AY885621	HM460077
Tubificidae/Naididae	Limnodriloidinae	<i>Thalassodrilides bruneti</i>	-	AY885625	GU902028
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Allonais paraguayensis</i>	-	GQ355399	GQ355439
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Amphichaeta raptisae</i>	-	GQ355400	GQ355440
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Chaetogaster diaphanus</i>	-	GQ355403	GQ355443
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Chaetogaster diastrophus</i>	-	GQ355404	GQ355444
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Dero furcata</i>	-	GQ355406	GQ355445
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Dero sp.</i>	-	GQ355407	GQ355446
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Nais communis</i>	-	GQ355408	GQ355448
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Nais elinguis</i>	-	GQ355409	GQ355449
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Ophidonais serpentina</i>	-	GQ355411	GQ355451
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Paranais frici</i>	-	GQ355412	GQ355452
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Paranais litoralis</i>	-	GQ355413	GQ355453
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Piguetiella michiganensis</i>	-	GQ355414	GQ355454
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Pristina aequisetata</i>	-	GQ355415	GQ355455
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Pristina leidy</i>	-	GQ355416	GQ355456
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Ripistes parasita</i>	-	DQ459946	GQ355458
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Slavina appendiculata</i>	-	GQ355418	GQ355459
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Specaria josinae</i>	-	GQ355419	GQ355460
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Stylaria lacustris</i>	-	GQ355420	GQ355461
Tubificidae/Naididae	Naidinae	<i>Vejdovskyella sp.</i>	-	GQ355421	GQ355462
Tubificidae/Naididae	Phallodrilinae	<i>Pirolodrilus minutus</i>	-	AY885590	GU902023
Tubificidae/Naididae	Rhyacodrilinae	<i>Monopylephorus rubroniveus</i>	-	GQ355422	GQ355464
Tubificidae/Naididae	Rhyacodrilinae	<i>Rhyacodrilus coccineus</i>	-	DQ459931	GU902025
Tubificidae/Naididae	Tubificinae	<i>Aulodrilus plurisetata</i>	-	HM459991	HM460073

Tubificidae/Naididae	Tubificinae	<i>Clitellio arenarius</i>	-	AY885615	HM460071
Tubificidae/Naididae	Tubificinae	<i>Ilyodrilus templetoni</i>	-	HM459992	HM460074
Tubificidae/Naididae	Tubificinae	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	-	EF089340	HM460076
Tubificidae/Naididae	Tubificinae	<i>Psammoryctides barbatus</i>	-	HM459993	HM460075
Tubificidae/Naididae	Tubificinae	<i>Tubifex ignotus</i>	-	HQ603819	HM460072
Tubificidae/Naididae	Tubificinae	<i>Tubifex tubifex</i>	-	JQ247511	GQ355465
Tubificidae/Naididae	Tubificinae	<i>Tubificoides amplivasatus</i>	-	AY340483	AY340421
Tubificidae/Naididae	Tubificinae	<i>Tubificoides brownae</i>	-	HM459977	HM460061

**Table S2.** 16s and 28S RNA sequences retrieved from Genbank representing the diversity of Tubificidae (currently Naididae), Branchiobdellida (including relatives) and Metagnophora (Crassiclitellata+Moniligastridae) plus *Capilloventer australis* as outgroup.



	PAR	BOA	SEV	CNG	TAM	BAR	HON	POL	SAL	ANC	VRN	LOY	SOT	PED	SIG	VLZ	GUA	MIR	HLY	F1	UCE	FRE	COL	LOZ	NAV	CAB	CUA	TB	VER	RED	MOL	TRE	TP	PR3	PR1	PR2	VEN	JAR	PIS	PNT3	PNT2	PR4	CAN	CHA	
PAR	0.2	9.0	9.3	13.4	13.9	13.1	13.8	12.9	12.3	14.5	14.5	14.1	14.1	14.9	13.9	13.9	14.1	13.9	13.2	13.5	16.0	16.3	15.9	15.2	15.0	15.8	15.6	14.5	14.6	15.2	14.9	14.5	14.6	15.1	15.1	15.8	14.7	14.8	14.7	14.9	14.7	14.8	14.3	13.8	
BOA	9.0	0.1	5.8	15.4	15.5	14.0	14.3	13.8	13.6	14.0	13.9	15.1	14.4	15.9	15.1	14.7	14.9	14.9	14.0	13.9	16.7	16.4	14.9	14.7	14.8	14.9	16.0	14.7	14.7	14.9	14.4	14.7	14.5	14.7	14.9	14.4	14.7	14.4	13.9	14.3	14.3	13.6			
SEV	9.3	5.8	0.2	14.9	14.6	14.2	13.1	14.0	12.9	13.8	15.2	14.9	14.5	14.0	14.3	13.4	14.5	14.6	13.9	14.1	16.3	15.5	14.7	14.5	15.1	15.9	16.6	15.5	15.5	14.2	15.4	14.9	15.0	15.6	15.8	15.4	14.1	14.2	14.2	14.0	13.9	14.4	14.3	13.6	
CNG	13.4	15.4	14.9	0.8	6.4	14.6	15.2	14.0	14.7	15.4	15.5	14.4	14.5	14.4	13.5	12.9	12.5	13.3	13.1	12.7	12.9	16.1	13.3	13.8	14.4	14.9	14.4	15.8	14.6	14.6	14.5	13.7	13.4	13.3	13.1	13.1	13.0	13.3	13.1	14.1	13.7	14.1	14.2	14.0	13.3
TAM	13.9	15.5	14.6	6.4	0.4	13.9	15.2	14.4	15.6	15.7	15.7	14.3	14.8	14.5	14.1	13.1	14.7	14.4	13.7	13.4	15.7	13.3	13.7	13.6	14.0	13.9	14.8	13.8	13.9	14.2	14.8	14.1	13.5	13.7	14.1	14.0	13.9	14.0	14.3	14.0	14.9	14.3	14.2	13.6	
BAR	13.1	14.0	14.2	14.6	13.9	1.1	10.4	10.2	13.9	14.4	13.8	12.2	12.8	12.3	12.8	11.9	13.1	13.3	12.3	12.5	13.8	13.6	13.1	14.0	14.1	13.7	14.5	13.4	13.3	12.6	13.2	12.7	13.0	13.0	13.1	13.2	12.7	13.0	12.3	12.4	12.7	12.5	12.3	13.1	
HON	13.8	14.3	13.1	15.2	15.2	10.4	0.0	5.6	13.0	14.8	13.3	13.3	12.6	13.3	12.5	12.8	13.0	13.4	12.5	15.0	13.6	14.0	14.1	14.1	14.1	14.6	13.6	13.7	13.4	13.8	14.3	14.3	14.5	14.4	14.6	13.6	13.9	13.6	13.6	13.4	13.4	13.3	13.5		
POL	12.9	13.8	14.0	14.0	14.4	10.2	5.6	2.0	14.3	15.5	14.9	13.4	13.8	13.4	13.6	12.5	14.3	14.4	13.5	13.4	15.4	14.3	13.7	14.1	13.0	13.7	14.5	13.0	13.1	13.5	13.3	13.6	13.1	12.8	12.4	12.4	13.2	13.6	13.1	13.5	13.0	12.8	12.7	13.7	
SAL	12.3	13.6	12.9	14.7	15.6	13.9	13.0	14.3	0.0	11.1	12.3	12.5	10.7	11.1	10.8	11.1	10.8	10.5	10.6	10.6	14.5	13.6	13.3	14.3	14.7	14.5	15.2	14.4	14.4	12.5	12.6	13.2	12.6	13.2	13.3	13.7	12.7	12.6	12.6	12.7	12.8	12.8	12.7	12.7	
ANC	14.5	14.0	13.8	15.4	15.7	14.4	14.8	15.5	11.1	0.3	9.5	14.6	12.4	12.4	12.1	12.1	12.3	12.8	12.6	12.8	14.6	14.1	13.5	13.6	13.0	12.6	13.5	13.0	13.0	12.7	13.2	13.1	13.2	13.5	13.2	13.6	12.1	11.8	12.0	11.7	11.7	11.5	11.9		
VRN	14.5	13.9	15.2	15.5	15.7	13.8	13.3	14.9	12.3	9.5	1.1	15.1	12.2	13.2	12.9	12.9	12.0	12.5	12.1	11.9	15.3	15.6	15.0	14.4	14.4	13.9	14.8	14.5	14.6	14.8	15.5	14.6	14.7	14.8	15.0	15.3	14.6	14.3	15.1	14.8	15.0	15.1	15.0	14.0	
LOY	14.1	15.1	14.9	14.4	14.3	12.2	13.3	13.4	12.5	14.6	15.1	0.0	12.7	12.5	12.7	12.2	12.4	12.0	12.4	12.2	13.0	13.4	13.7	14.3	13.2	13.8	14.4	13.6	13.7	13.3	13.5	13.9	14.1	12.8	13.1	13.4	13.5	13.0	13.0	12.9	13.4	13.3	13.2	13.6	
SOT	14.1	14.4	14.5	13.5	14.8	12.8	12.6	13.8	10.7	12.4	12.2	12.7	0.3	4.9	2.3	5.8	0.9	1.3	2.3	2.1	15.0	13.7	14.2	14.2	14.2	14.4	15.3	14.0	14.0	12.4	12.5	12.0	11.6	12.0	12.2	12.2	12.4	12.4	12.2	12.0	11.9	12.1	11.9	13.3	
PED	14.9	15.9	14.0	13.5	14.5	12.3	13.0	13.4	11.1	12.4	13.2	12.5	4.9	0.3	5.2	3.3	5.4	5.7	5.8	5.8	15.1	13.9	14.5	14.5	14.2	14.7	15.6	14.5	14.5	12.5	13.0	12.7	12.2	13.0	12.5	13.1	12.3	12.3	12.4	12.1	11.7	12.2	12.1	12.6	
SIG	13.9	15.1	14.3	12.9	14.1	12.8	12.5	13.6	10.8	12.1	12.9	12.7	2.3	5.2	0.8	6.1	2.3	2.8	3.2	3.1	14.8	13.8	14.7	14.0	14.2	14.1	14.9	13.7	13.7	11.7	12.3	11.7	11.2	12.2	12.0	12.0	12.1	12.0	11.8	11.8	11.4	11.3	12.4		
VLZ	13.9	14.7	13.4	12.5	13.1	11.9	12.8	12.5	11.1	12.1	12.9	12.2	5.8	3.3	6.1	1.0	6.3	6.6	6.4	6.3	13.5	13.1	14.0	13.3	13.6	13.7	14.8	13.0	13.0	12.0	12.5	11.9	11.8	11.9	11.4	11.9	11.4	11.5	11.1	11.1	11.1	11.1	11.0	12.6	
GUA	14.1	14.9	14.5	13.3	14.7	13.1	13.0	14.3	10.8	12.3	12.0	12.4	0.9	5.4	2.3	6.3	0.1	0.7	2.5	2.4	14.8	13.8	14.1	14.3	14.0	14.2	14.9	13.8	13.8	12.3	12.7	12.0	11.9	12.1	12.2	12.3	12.3	12.4	12.0	11.8	11.9	12.2	12.1	13.6	
MIR	13.9	14.9	14.6	13.1	14.4	13.3	13.4	14.4	10.5	12.8	12.5	12.0	1.3	5.7	2.8	6.6	0.7	0.6	2.8	2.4	15.1	14.0	14.2	14.2	14.5	14.7	15.3	14.3	14.3	12.4	13.0	12.2	11.9	11.9	12.0	12.1	12.5	12.7	12.1	12.0	12.2	12.2	13.7		
HLY	13.2	14.0	13.9	12.7	13.7	12.3	12.5	13.5	10.6	12.6	12.1	12.4	2.3	5.8	3.2	6.4	2.5	2.8	1.0	1.1	14.8	13.6	13.7	13.7	13.7	13.5	15.0	13.1	13.0	12.1	12.1	11.4	11.3	11.6	11.6	11.7	11.7	11.9	11.8	11.5	11.6	11.8	12.6		
F1	13.5	13.9	14.1	12.9	13.4	12.5	12.5	13.4	10.6	12.8	11.9	12.2	2.1	5.8	3.1	6.3	2.4	2.4	1.1	0.1	15.2	14.2	13.9	13.8	14.3	14.1	15.4	13.6	13.6	12.5	12.6	11.7	11.6	11.7	11.8	12.2	12.3	12.2	12.0	12.1	12.1	11.9	13.3		
UCE	16.0	16.7	16.3	16.1	15.7	13.8	15.0	15.4	14.5	14.6	15.3	13.0	15.0	15.1	14.8	13.5	14.8	15.1	14.8	15.2	1.0	14.0	14.1	14.1	13.7	14.3	14.2	13.7	13.6	11.8	13.4	13.5	13.4	13.4	13.7	13.7	11.7	12.1	12.3	12.7	12.6	12.7	12.6	13.4	
FRE	16.3	16.4	15.5	13.3	13.3	13.6	13.6	14.3	13.6	14.1	15.6	13.4	13.7	13.9	13.8	13.1	13.8	14.0	13.6	14.2	14.0	3.4	7.3	13.3	12.5	13.3	13.7	12.5	12.6	11.8	11.9	12.6	12.9	13.0	12.7	12.6	11.5	11.3	12.1	11.9	11.7	12.4	12.4	11.9	
COL	15.9	14.9	14.7	13.8	13.7	13.1	14.0	13.7	13.3	13.5	15.0	13.7	14.2	14.5	14.7	14.0	14.1	14.2	13.7	13.9	14.1	7.3	0.5	12.0	11.5	11.3	12.8	11.4	11.4	12.0	11.1	11.3	11.0	10.8	10.8	11.2	11.4	11.5	12.0	12.1	11.6	12.1	12.0	11.8	
LOZ	15.2	14.7	14.5	14.4	13.6	14.0	14.0	14.1	14.3	13.6	14.4	14.3	14.2	14.5	14.0	13.3	14.3	14.2	13.7	13.8	14.1	13.3	12.0	0.9	4.1	4.2	4.5	3.9	3.9	9.9	10.4	10.1	10.0	10.6	10.5	10.1	9.9	9.9	10.1	10.0	9.9	9.8	9.8	9.7	
NAV	15.0	14.8	15.1	14.9	14.0	14.1	13.3	13.0	14.7	13.0	14.4	13.2	14.2	14.2	14.2	13.6	14.0	14.5	13.7	14.3	13.7	12.5	11.5	4.1	0.4	3.0	3.5	2.9	3.0	9.3	9.5	9.9	9.7	10.0	10.2	10.3	9.4	9.9	9.6	9.4	9.6	9.3	9.3	9.0	
CAB	15.8	14.9	15.9	14.4	13.9	13.7	14.1	13.7	14.5	12.6	13.9	13.8	14.4	14.1	13.7	14.2	14.7	13.5	14.1	14.3	13.3	11.3	4.2	3.0	0.0	3.6	2.2	2.2	9.0	9.6	9.8	9.3	9.8	9.7	9.7	9.1	9.4	9.3	9.0	9.5	9.3	9.2	9.0		
CUA	15.6	16.0	16.6	15.8	14.8	14.5	14.6	14.5	15.2	13.5	14.8	14.4	15.3	15.6	14.9	14.8	14.9	15.3	15.0	15.4	14.2	13.7	12.8	4.5	3.5	3.6	0.3	3.7	3.7	9.6	10.8	10.6	10.3	10.7	10.9	10.8	9.9	10.3	9.9	10.1	9.9	9.7	9.6	9.6	
TB	14.5	14.7	15.5	14.6	13.8	13.4	13.6	13.0	14.4	13.0	14.5	13.6	14.0	14.5	13.7	13.0	13.8	14.3	13.1	13.6	13.7	12.5	11.4	3.9	2.9	2.2	3.7	0.0	0.1	8.6	9.4	9.5	9.0	9.6	9.4	9.4	8.8	9.4	8.6	8.6	9.1	8.8	8.8	9.0	
VER	14.6	14.7	15.5	14.6	13.9	13.3	13.7	13.1	14.4	13.0	14.6	13.7	14.0	14.5	13.7	13.0	13.8	14.3	13.0	13.6	13.6	12.6	11.4	3.9	3.0	2.2	3.7	0.1	0.2	8.6	9.4	9.5	9.0	9.5	9.4	9.4	8.8	9.4	8.6	8.6	9.0	8.8	8.8	9.0	
RED	15.2	14.9	14.2	14.5	14.2	12.6	13.4	13.5	12.5	12.7	14.8	13.3	12.4	12.5	11.7	12.0	12.3	12.4	12.1	12.5	11.8	11.8	12.0	9.9	9.3	9.0	9.6	8.6	8.6	2.9	6.5	6.7	6.5	7.7	7.8	7.7	4.4	5.4	4.0	4.4	4.2	4.2	4.1	5.4	
MOL	14.9	14.9	15.4	13.7	14.8	13.2	13.8	13.3	12.6	13.2	15.5	13.5																																	

	ANC	BAR	BOA	CAB	CAN	CHA	CNG	COL	CUA	F1	FRE	GUA	HLV	HON	JAR	LOY	LOZ	MIR	MOL	NAV	PAR	PED	PIS	PNT2	PNT3	POL	PR1	PR2	PR3	PR4	RED	SAL	SEV	SIG	SOT	TAM	TB	TP	TRE	UCE	VEN	VER	VLZ	VRN							
ANC	0.00																																																		
BAR	0.95	0.00																																																	
BOA	0.99	0.95	0.00																																																
CAB	0.98	0.92	0.99	0.00																																															
CAN	0.97	0.94	0.99	0.97	0.00																																														
CHA	0.95	0.92	0.96	0.89	0.88	0.00																																													
CNG	0.97	0.94	0.97	0.95	0.96	0.94	0.00																																												
COL	0.97	0.93	0.98	0.95	0.96	0.94	0.95	0.00																																											
CUA	0.98	0.94	0.99	0.91	0.97	0.93	0.96	0.96	0.00																																										
F1	0.99	0.96	0.99	0.99	0.97	0.97	0.98	0.99	0.00																																										
FRE	0.94	0.88	0.94	0.74	0.91	0.87	0.90	0.82	0.90	0.95	0.00																																								
GUA	0.99	0.97	1.00	1.00	0.99	0.98	0.98	0.99	0.99	0.97	0.97	0.00																																							
HLV	0.96	0.91	0.97	0.92	0.95	0.93	0.95	0.96	0.64	0.86	0.89	0.00																																							
HON	0.99	0.93	1.00	1.00	0.99	0.96	0.97	0.98	0.99	0.92	1.00	0.96	0.00																																						
JAR	0.93	0.90	0.94	0.85	0.75	0.80	0.92	0.91	0.90	0.94	0.85	0.95	0.89	0.93	0.00																																				
LOY	0.98	0.91	0.99	1.00	0.98	0.93	0.95	0.96	0.98	0.99	0.75	0.99	0.92	1.00	0.89	0.00																																			
LOZ	0.96	0.93	0.96	0.79	0.93	0.91	0.94	0.84	0.86	0.90	0.97	0.93	0.95	0.89	0.94	0.00																																			
MIR	0.97	0.93	0.97	0.96	0.96	0.94	0.95	0.96	0.97	0.86	0.91	0.58	0.73	0.97	0.92	0.95	0.95	0.00																																	
MOL	0.96	0.93	0.96	0.91	0.89	0.86	0.94	0.93	0.93	0.96	0.90	0.97	0.93	0.95	0.82	0.94	0.92	0.94	0.00																																
NAV	0.97	0.95	0.98	0.88	0.96	0.93	0.96	0.96	0.90	0.98	0.93	0.99	0.96	0.98	0.91	0.97	0.84	0.97	0.93	0.00																															
PAR	0.98	0.95	0.98	0.98	0.98	0.98	0.96	0.98	0.98	0.99	0.94	0.99	0.96	0.98	0.99	0.96	0.96	0.97	0.96	0.98	0.00																														
PED	0.98	0.92	0.99	0.98	0.97	0.94	0.95	0.97	0.98	0.98	0.87	0.98	0.87	0.99	0.90	0.98	0.95	0.90	0.94	0.97	0.98	0.00																													
PIS	0.95	0.91	0.96	0.89	0.50	0.83	0.94	0.93	0.92	0.96	0.88	0.97	0.92	0.95	0.71	0.92	0.91	0.93	0.85	0.93	0.96	0.93	0.00																												
PNT2	0.97	0.92	0.99	0.95	0.76	0.86	0.95	0.96	0.96	0.99	0.83	0.99	0.93	0.99	0.68	0.97	0.92	0.95	0.86	0.98	0.97	0.48	0.00																												
PNT3	0.97	0.93	0.98	0.95	0.77	0.87	0.95	0.96	0.98	0.90	0.98	0.94	0.99	0.96	0.98	0.77	0.96	0.93	0.95	0.88	0.96	0.45	0.76	0.00																											
POI	0.93	0.85	0.92	0.86	0.90	0.89	0.90	0.90	0.90	0.93	0.84	0.95	0.88	0.77	0.88	0.85	0.91	0.91	0.90	0.92	0.91	0.88	0.89	0.87	0.90	0.00																									
PR1	0.97	0.93	0.98	0.95	0.94	0.90	0.95	0.95	0.96	0.98	0.88	0.99	0.93	0.98	0.85	0.96	0.93	0.95	0.88	0.96	0.96	0.88	0.92	0.93	0.88	0.00																									
PR2	0.98	0.93	0.99	0.95	0.95	0.90	0.95	0.95	0.97	0.99	0.85	0.99	0.93	0.99	0.83	0.97	0.92	0.95	0.88	0.96	0.98	0.97	0.87	0.93	0.93	0.87	0.66	0.00																							
PR3	0.96	0.92	0.97	0.90	0.91	0.87	0.93	0.93	0.94	0.97	0.86	0.98	0.91	0.96	0.83	0.92	0.91	0.94	0.85	0.94	0.96	0.94	0.86	0.88	0.90	0.87	0.40	0.53	0.00																						
PR4	0.98	0.91	0.99	1.00	0.00	0.82	0.95	0.96	0.97	0.99	0.73	0.99	0.91	1.00	0.64	1.00	0.91	0.95	0.86	0.96	0.98	0.97	0.27	0.68	0.72	0.85	0.92	0.93	0.85	0.00																					
RED	0.85	0.82	0.86	0.68	0.52	0.59	0.85	0.82	0.77	0.86	0.75	0.88	0.80	0.84	0.59	0.78	0.80	0.83	0.70	0.80	0.87	0.80	0.47	0.43	0.54	0.81	0.71	0.68	0.69	0.31	0.00																				
SAL	0.97	0.92	0.99	1.00	0.98	0.93	0.95	0.96	0.98	0.99	0.75	0.99	0.90	1.00	0.89	1.00	0.94	0.94	0.93	0.97	0.98	0.97	0.92	0.96	0.96	0.86	0.96	0.97	0.92	1.00	0.77	0.00																			
SEV	0.98	0.94	0.98	0.99	0.98	0.95	0.96	0.97	0.98	0.99	0.92	0.99	0.96	0.99	0.93	0.99	0.95	0.97	0.96	0.98	0.98	0.98	0.98	0.95	0.98	0.97	0.90	0.98	0.98	0.96	0.99	0.84	0.00																		
SIG	0.95	0.93	0.96	0.94	0.94	0.93	0.94	0.95	0.95	0.85	0.91	0.83	0.73	0.95	0.91	0.94	0.94	0.74	0.93	0.96	0.96	0.86	0.93	0.93	0.94	0.91	0.94	0.94	0.93	0.93	0.83	0.93	0.95	0.00																	
SOT	0.98	0.93	0.99	0.98	0.97	0.95	0.95	0.97	0.98	0.93	0.90	0.87	0.70	0.99	0.91	0.98	0.95	0.62	0.94	0.98	0.98	0.94	0.94	0.97	0.97	0.90	0.97	0.97	0.94	0.97	0.82	0.97	0.98	0.71	0.00																
TAM	0.98	0.94	0.98	0.97	0.97	0.95	0.91	0.97	0.97	0.98	0.92	0.99	0.95	0.98	0.93	0.97	0.95	0.96	0.95	0.97	0.98	0.97	0.95	0.97	0.92	0.97	0.97	0.95	0.97	0.86	0.97	0.98	0.95	0.97	0.00																
TB	0.99	0.97	1.00	0.98	0.99	0.96	0.98	0.98	0.97	1.00	0.96	1.00	0.98	1.00	0.94	1.00	0.89	0.98	0.96	0.94	0.99	1.00	0.96	0.99	0.98	0.94	0.98	0.99	0.97	1.00	0.82	1.00	1.00	0.97	0.99	0.99	0.00														
TP	0.96	0.93	0.96	0.92	0.90	0.88	0.94	0.94	0.94	0.96	0.91	0.97	0.93	0.96	0.84	0.95	0.92	0.94	0.86	0.94	0.96	0.95	0.87	0.88	0.90	0.91	0.77	0.78	0.74	0.88	0.72	0.94	0.96	0.93	0.95	0.95	0.96	0.00													
TRE	0.84	0.78	0.83	0.56	0.58	0.61	0.81	0.76	0.73	0.83	0.67	0.87	0.72	0.80	0.59	0.69	0.77	0.80	0.52	0.78	0.84	0.73	0.56	0.45	0.59	0.77	0.47	0.41	0.43	0.30	0.49	0.67	0.81	0.81	0.76	0.83	0.82	0.57	0.00												
UCE	0.96	0.92	0.96	0.93	0.94	0.93	0.94	0.94	0.94	0.96	0.90	0.97	0.93	0.95	0.90	0.92	0.93	0.94	0.93	0.95	0.96	0.94	0.92	0.93	0.94	0.91	0.94	0.93	0.92	0.82	0.93	0.95	0.94	0.95	0.95	0.97	0.94	0.81	0.00												
VEN																																																			

# **Capítulo VIII- Revisión sistemática integrativa de una familia de lombrices de tierra mediterránea: Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta)**

## **Resumen**

La reconciliación entre taxonomía y filogenia en lombrices de tierra ha avanzado con la aplicación de técnicas moleculares, que aún así son insuficientes. La sistemática integrativa podría resolver el problema combinando múltiples fuentes de información evolutiva. La diversidad relativamente baja, distribución restringida y escaso conflicto nomenclatorial hacen de Hormogastridae Michaelsen, 1900 un objetivo ideal para dicho método. Los conflictos sistemáticos principales de la familia son la polifilia de la especie *Hormogaster pretiosa* Michaelsen, 1899, la amplia presencia de linajes crípticos, la falta de resolución de las relaciones supraespecíficas y la parafilia del género *Hormogaster* Rosa, 1877 (compuesto por cuatro clados de nivel género bien soportados según filogenias moleculares). Este trabajo integra toda la información existente realizando inferencias filogenéticas basadas en datos morfológicos, moleculares y combinados y comparando su rendimiento con la topología filogenómica. También incluye un estudio comparado de representantes de los clados principales con reconstrucciones por tomografía computarizada (microcomputed tomography,  $\mu$ CT). La inclusión de caracteres morfológicos mejoró la resolución del árbol de Hormogastridae; el análisis de reconstrucción de estados ancestrales ilustró la evolución de los estados de carácter y proporcionó diagnósticos morfológicos para los géneros del nuevo sistema, que incorpora también información sobre nichos ecológicos y biogeografía.

# Integrative systematic revision of a Mediterranean earthworm family: Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta)

Daniel Fernández Marchán<sup>a</sup>, Marta Novo<sup>b</sup>, Rosa Fernández<sup>c</sup>, Irene de Sosa<sup>a</sup>, Nuria Sánchez<sup>a</sup>, Darío J. Díaz Cosín<sup>a</sup>

a) Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis 2, 28040, Madrid, Spain

b) Environmental Toxicology and Biology, Departamento de Física Matemática y de Fluídos, Facultad de Ciencias UNED, C/ Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

c) Centre for Genomic Regulation, Carrer del Dr. Aiguader, 88, 08003 Barcelona, Spain

Corresponding author: Daniel F. Marchán; Address: Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis 2, 28040, Madrid, Spain; E-mail: [danifermch@gmail.com](mailto:danifermch@gmail.com)

**Keywords:** morphology, molecular markers, total evidence analysis, microcomputed tomography, ancestral character state reconstruction

## Abstract

The problem of reconciling earthworm taxonomy and phylogeny has shown advances with the application of molecular techniques, yet they have proven insufficient. Integrative systematics could solve the problem by combining multiple sources of evolutionary information. Relatively low diversity, restricted range and low nomenclatorial conflict make Hormogastridae Michaelsen, 1900 a desirable target for said approach. The main systematic conflicts within this family are the polyphyly of the species *Hormogaster pretiosa* Michaelsen, 1899, the widespread presence of cryptic lineages, the lack of resolution of supraspecific relationships and the paraphyly of the genus *Hormogaster* Rosa, 1877 (found to be composed of four well-supported genus-level clades by molecular phylogenetic inference).

## Discusión general

Los conocimientos sobre la familia Hormogastridae reunidos en esta Tesis, si bien están lejos de resolver todas las preguntas que nos plantea este grupo de lombrices de tierra, la acercan mucho a otras familias más estudiadas como los lumbrícidos. Este punto de partida debería de permitir su inclusión en estudios ecológicos de comunidades, en muestreos llevados a cabo por no-especialistas, en planes de difusión del conocimiento y divulgación con los distintos sectores de la sociedad civil, y no menos importante, en planes de conservación de la diversidad.

El escenario que presentaba la antigua taxonomía de Hormogastridae mostraba un grupo homogéneo, diverso y ampliamente extendido por la Cuenca Mediterránea Occidental. Sin embargo, el panorama actual es muy distinto, tras crear cuatro nuevos géneros (*Boucheona*, *Carpetania*, *Diazcosinia* e *Ilithyia*) a partir de un *Hormogaster* parafilético. Si bien *Hormogaster* en sentido estricto y *Boucheona* son dos géneros aparentemente muy exitosos por su amplia área de distribución, diversidad interna y adaptación a diferentes hábitats y condiciones, los otros siete géneros presentan áreas de distribución restringidas y nichos más reducidos. Aunque algunos de estos géneros pueden llegar a ser muy abundantes y tener una alta diversidad genética localmente (como *Carpetania*), otros son extremadamente difíciles de encontrar, conociéndose apenas fuera de sus localidades típicas. Los ejemplos más extremos son *Ailoscolex* y *Xana*, cada uno con una única especie citada raramente en zonas bien muestreadas para diversidad de lombrices de tierra como son Francia y el Noroeste de la Península Ibérica. Estos géneros, portadores de una gran parte de la historia evolutiva de un linaje tan antiguo como la familia Hormogastridae, podrían desaparecer con extremada facilidad si las intervenciones antrópicas alcanzan sus reducidos refugios.

Por dos razones muy opuestas (su gran representación en un amplio abanico de hábitats, o su rareza y vulnerabilidad) todos los hormogástridos presentan la necesidad de llevar su estudio a nuevos campos, como su interacción con otras especies tanto de lombrices de tierra como de otros grupos animales, sus preferencias ecológicas en mosaicos de usos del suelo, su tolerancia a las perturbaciones antrópicas y su relevancia como proveedores de servicios ecosistémicos.

Las herramientas empleadas y evaluadas en esta tesis presentan un gran potencial para ser empleadas a la familia Hormogastridae ampliando el número de taxones representados o empleando un mayor esfuerzo de análisis. Sin embargo, el potencial parece aún mayor si se hacen extensivas a otras familias de lombrices de tierra. La modelización comparada de nicho, por ejemplo, es tanto más potente cuantas más localidades se conozcan para un taxón determinado: muchos lumbrícidos presentan amplias bases de datos detallando su distribución. No sólo sería interesante comparar las diferencias de nichos entre géneros o especies; también podrían compararse los nichos de las especies invasivas en su área de distribución nativa y en áreas donde hayan sido introducidas, o en áreas conservadas frente a áreas perturbadas. El estudio de las quetas especializadas (muy relevante en Megascolecidae, Acanthodrilidae, Kynotidae, Eudrilidae o Benhamiidae) podría enriquecerse aplicando las técnicas de morfometría geométrica, sobre todo en casos donde aparezcan complejos de especies crípticas. Asimismo, la relación entre la complejidad del tiflosol y las presiones evolutivas morfo-ecológicas podrían arrojar resultados sorprendentes al integrar datos sobre las diferentes familias que lo presentan, ya que en algunos casos se sospecha que su origen ha sido independiente. No cabe duda de que la aplicación de las reconstrucciones basadas en  $\mu$ CT podría ser clave en la comprensión de estructuras morfológicas complejas como los distintos sistemas de próstatas en Megascolécidos y Acanthodrilidos o las glándulas calcíferas de Rhinodrilidae;

pero también podrían permitir la interpretación morfofuncional de la variabilidad en estructuras más simples como la musculatura faríngea, las mollejas o los ganglios cerebroideos. Por último, la reevaluación e incorporación de caracteres morfológicos en análisis filogenéticos de evidencia total debería aplicarse a otras familias de lombrices de tierra para comprobar si dicha aproximación es tan exitosa como en Hormogastridae o proporciona resultados menos alentadores como en Lumbricidae (Domínguez *et al.* 2015); en el primer caso podría ser clave para desenmarañar las complicadas relaciones filogenéticas de las lombrices de tierra en todos los niveles taxonómicos.

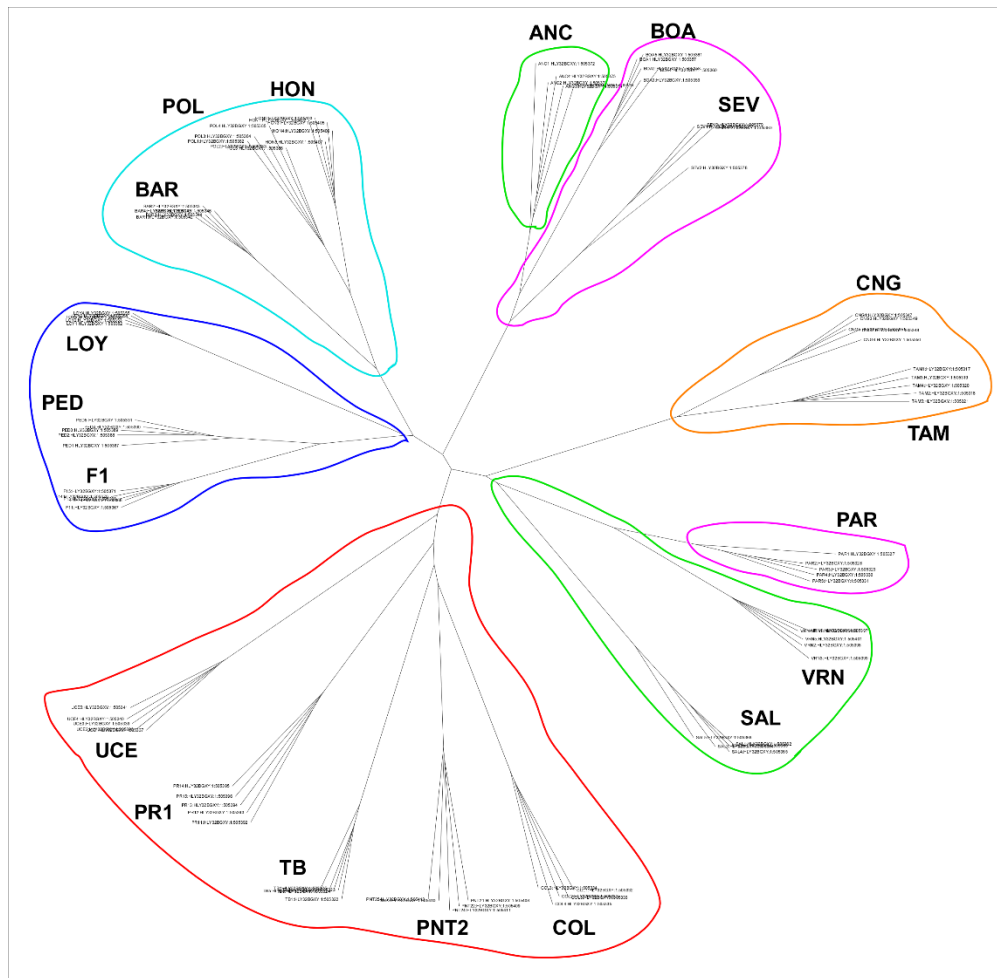
La comprensión de la historia evolutiva de *Carpetania* (antiguo complejo *H. elisae*) ya la convierte en un interesante modelo no sólo en lombrices de tierra, sino también de gran interés general para comprender la especiación críptica y los procesos de especiación en el mundo animal. El linaje ancestral de *Carpetania* y su pariente más cercano, *Diazcosinia*, habrían tenido la oportunidad de alcanzar el centro de la Península Ibérica a principios del Cretácico Superior, hace más de 95 millones de años, cuando un puente de terrenos emergidos conectaba el Macizo Ibérico y el Macizo del Ebro. Desde entonces hasta hace 75 millones de años, varios ciclos de introgresiones y regresiones marinas podrían explicar el aislamiento de estos géneros entre sí y de sus parientes más lejanos, así como la ausencia de poblaciones intermedias en el territorio que se corresponde con la antigua plataforma continental (buena parte de Soria, Guadalajara, Zaragoza, Teruel y Cuenca). Hace 65 millones de años, la retirada definitiva del mar epicontinental que cubría la mayor parte de los territorios actuales de Carpetania (Comunidad de Madrid, Segovia, Soria y Guadalajara) habría podido permitir el inicio de la diversificación y expansión del género. El origen y elevación del Sistema Central, y la formación de una cuenca endorréica y su posterior paso a un régimen endorréico podrían haber influido en el aislamiento y distribución actual de los linajes crípticos. Actualmente, barreras

ambientales crípticas y un cierto grado de aislamiento reproductivo (sugerido por cruzamientos en laboratorio) podrían estar detrás del mantenimiento de la separación geográfica y genética de estos linajes. Además ya se han podido encontrar algunas pistas que señalan la posible entidad de los linajes crípticos como buenas especies biológicas. Junto con los indicios de aislamiento reproductivo y las diferencias morfométricas en las quetas genitales, parece haber otras diferencias morfológicas más sutiles como el grado de desplazamiento del septo 9/10 y la disposición de las espermatecas respecto a él que han sido pasadas por alto y merecen atención en el futuro.

La asignatura pendiente en este grupo es la delimitación de sus linajes en especies crípticas. Actualmente disponemos de una base de datos generada mediante la técnica de nueva generación GBS (Genotyping-By-Sequencing, Elshire *et al.* 2011) que aún no ha podido ser analizada. Esta técnica proporciona un barrido de baja cobertura de todo el genoma, obteniendo decenas de miles de SNPs (single nucleotid polymorphisms o polimorfismos de base única) en una gran cantidad de individuos: gracias a ello se han podido incluir 5 individuos de 19 poblaciones representando todos los clados y subclados de *Carpetania*. Nuevos algoritmos de delimitación de especies como BFD (Bayes Factor Delimitation, Leaché *et al.* 2014) permiten contrastar distintas hipótesis de partida incorporando información de un número tan amplio de loci (Razkin *et al.* 2016). Estos datos son también ideales para detectar posible flujo genético entre las poblaciones de los distintos linajes, tanto reciente como antiguo. Además de todas estas ventajas, la posibilidad de filtrar la variabilidad genética que se encuentra únicamente en regiones codificantes (gracias al alineamiento con el transcriptoma de *Carpetania elisae* -Novo *et al.* 2013) podría permitir encontrar proteínas que hayan divergido durante el proceso de especiación del complejo, además de inferir cuáles se encuentran bajo selección (Silva-Brandão 2015). Los resultados preliminares confirman la clara separación de los linajes



crípticos mostrada por los marcadores moleculares COI, 16S, tRNAs, 28S y H3, aunque con algunas diferencias (figura 1).



**Figura 1.** Red preliminar de Neighbor-Joining obtenida a partir de 85.063 SNPs en Tassel. Los códigos de las poblaciones y los colores de los linajes se corresponden con los utilizados en el capítulo VII.

# Conclusiones

## Capítulo II

-Una nueva especie de hormogástrido fue encontrada en Rudilla, Teruel, en el área intermedia entre el territorio de *Carpetania* y el resto de hormogástridos del Noroeste de la Península Ibérica.

-La nueva especie fue descrita como *Hormogaster joseantonioi* (actualmente *Diazcosinia joseantonioi*), mostrando una combinación de caracteres morfológicos única en Hormogastridae: espermatecas multicamerales en disco dobles, nueve laminillas en el tiflosol y septo 9/10 desplazado posteriormente dos segmentos.

-*Hormogaster joseantonioi* es el grupo hermano de *Carpetania* de acuerdo con las reconstrucciones filogenéticas.

## Capítulo III

-Maxent fue adecuado para predecir el nicho ecológico de *Carpetania*.

-Las variables ambientales a gran escala elegidas son indicadores indirectos de las variables del suelo relevantes para *Carpetania*.

-La capacidad de otorgar valores de idoneidad significativamente mayores a localidades con presencia que a localidades con ausencia demuestra la capacidad predictiva del modelo obtenido.

## Capítulo IV

-MaxEnt permitió predecir los habitats altamente adecuados para los principales clados de Hormogastridae, con diferencias en el rendimiento y precisión.

- Fue posible caracterizar las preferencias ecológicas diferenciales de los clados mediante las variables con mayor contribución a sus modelos de nicho y los valores más favorables. La precipitación influye principalmente a los clados Noreste Ibérico, Central Ibérico y Tirrénico, prefiriendo habitats más húmedos los primeros y más secos los últimos. Las bajas temperaturas influyen al clado Disyunto, los usos del suelo al clado Noreste Ibérico y la litología a ambos.
- Los nichos de los cuatro clados estudiados son significativamente diferentes. El nicho ecológico del clado Noreste Ibérico es el más amplio y con gran solapamiento con el resto, mientras que el del clado Tirrénico parece ser más estrecho de lo esperado.
- Se encontró una buena concordancia entre los nichos predichos y realizados estimados por Maxent y sPCA.

## **Capítulo V**

- El incremento del peso corporal parece ser la principal presión evolutiva en el desarrollo del tiflosol multilamelar de los hormogástridos, aunque la textura y riqueza del suelo también parecen estar implicados.
- El número de laminillas del Tiflosol y el peso promedio presentan una fuerte señal filogenética, lo que les convierte en caracteres relevantes en sistemática. Por el contrario las variables del suelo mostraron una señal filogenética más débil.
- Se infirió una possible radiación adaptativa temprana en el Tiflosol multilamelar, lo que es congruente con el trasfondo evolutivo de la familia Hormogastridae.

## Capítulo VI

-Las quetas genitales de Hormogastridae contienen información filogenética relevante a nivel interespecífico y supraespecífico. Esto confirma su utilidad en la sistemática de lombrices de tierra.

-La variabilidad morfológica en la parte distal de las quetas genitales, incluyendo estructuras especializadas como dentículos y poros, pone de manifiesto la importancia de estudiar su papel y función en la reproducción de lombrices de tierra.

-La forma de la parte distal de las quetas genitales permite diferenciar los linajes crípticos del complejo *H. elisae* mediante el uso de la morfometría geométrica

## Capítulo VII

-Los linajes crípticos de *Hormogaster elisae* no solapan sus áreas de distribución, y se han encontrado coexistiendo en la misma localidad con muestreos a escala fina.

-No se encontró flujo génico entre los linajes crípticos de *H. elisae*, ni siquiera en fronteras tan estrechas como 700 metros.

-La limitada capacidad dispersiva activa y la presencia de barreras ecológicas o bióticas podrían explicar el aislamiento de los diferentes linajes crípticos. Eventos puntuales de dispersión a larga distancia por hidrocoria (probablemente asociada a inundaciones) podrían ser una de las causas de la expansión del área de distribución de ciertos linajes.

-Aunque limitada, la aproximación al marco temporal de la diversificación de *H. elisae* fue potencialmente superior a métodos usados previamente en lombrices de tierra al omitir las asunciones de vicarianza. La filogenia calibrada junto con la reconstrucción de escenarios paleogeográficos compatibles proporcionaron algunas hipótesis sobre la influencia de las transgresiones marinas y los eventos tectónicos en la evolución y distribución del complejo.

## Capítulo VIII

-La inclusión de una matriz morfológica revisada en el análisis filogenético de la familia Hormogastridae proporcionó una mayor resolución de las relaciones filogenéticas entre los clados principales.

-La integración de filogenia, diagnosis morfológicas, información biogeográfica y ecológica permitió la revisión del sistema de géneros de Hormogastridae resultando en el mantenimiento de *Hemigastrodrilus*, *Vygnisa* y *Xana*, la incorporación del género *Ailoscolex* y la división del género *Hormogaster* creándose 4 géneros adicionales: *Boucheona*, *Ilithyia*, *Carpetania* y *Diazcosinia*.

-La reconstrucción de caracteres ancestrales mostró un gran número de caracteres autapomórficos propios de cada clado, mientras que otros mostraron diferentes grados de homoplasia o plesiomorfía. Aun así, estos últimos se presentaron en combinaciones únicas para los diferentes clados. Ambos tipos de caracteres permitieron desarrollar diagnosis morfológicas para los géneros, incluyendo una clave de identificación.

## Bibliografía de introducción y discusión

- Álvarez, J. (1971). Oligoquetos terrícolas ibéricos. Megascólécidos y Glososcolécidos. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)* **69**: 97-114.
- Álvarez, J. (1977). El género *Hormogaster* en España. *Publicaciones del Centro Pirenaico de Biología Experimental* **9**: 27-35.
- Amossé, J., Turberg, P., Kohler-Milleret, R., Gobat, J. M., Le Bayon, R. C. (2015). Effects of endogeic earthworms on the soil organic matter dynamics and the soil structure in urban and alluvial soil materials. *Geoderma*, **243**, 50-57.
- Barley, K. P. (1958). The influence of earthworms on soil fertility. II. Consumption of soil organic matter by the earthworm *Allolobophora caliginosa* (Savigny). *Australian Journal of Agricultural Research* **10**: 179-185.
- Bertrand, M., Barot, S., Blouin, M., Whalen, J., De Oliveira, T., Roger-Estrade, J. (2015). Earthworm services for cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **35**(2), 553-567.
- Bescansa, P., Virto, I., Fernández-Ugalde, O., Imaz, M. J., Enrique, A. (2010). Casting activity of *Scherotheca gigas* in no-till Mediterranean soils: role in organic matter incorporation and influence of aridity. *Applied and Environmental Soil Science*, **2010**.
- Blouin, M., Barot, S., Lavelle, P. (2006). Earthworms (*Millsonia anomala*, Megascolecidae) do not increase rice growth through enhanced nitrogen mineralization. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(8), 2063-2068.
- Blouin, M., Hodson, M. E., Delgado, E. A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K. R., Cluzeau, D. (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, **64**(2), 161-182.

- Bouché, M. B. (1970). Remarques sur quelques Lumbricina de France et conséquences de la découverte des nouveaux taxons Vignysinae (Subfam. nov) et Diporodrilidae (Fam. nov.). *Pedobiologia* **10**: 246–256.
- Bouché, M. B. (1972) Lombriciens de France, Écologie et Systématique. INRA, Paris, p. 671.
- Boyer, S., Kim, Y. N., Bowie, M. H., Lefort, M. C., Dickinson, N. M. (2016). Response of endemic and exotic earthworm communities to ecological restoration. *Restoration Ecology*, 24(6), 717-721.
- Briones, M. J. I., Morán, P., Posada, D. (2009). Are the sexual, somatic and genetic characters enough to solve nomenclatural problems in lumbricid taxonomy? *Soil Biology and Biochemistry*, **41**, 2257–2271.
- Brown, G. G., Barois, I., Lavelle, P. (2000). Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology*. 36:177–198.
- Capowiez, Y., Cadoux, S., Bouchant, P., Ruy, S., Roger-Estrade, J., Richard, G., Boizard, H. (2009). The effect of tillage type and cropping system on earthworm communities, macroporosity and water infiltration. *Soil and Tillage Research*, 105(2), 209-216.
- Clause, J., Barot, S., Richard, B., Decaëns, T., Forey, E. (2014). The interactions between soil type and earthworm species determine the properties of earthworm casts. *Applied Soil Ecology*, 83, 149-158.
- Clause, J., Barot, S., Forey, E. (2016). Earthworms promote greater richness and abundance in the emergence of plant species across a grassland-forest ecotone. *Journal of Plant Ecology*, rtw008.

- Cobolli Sbordoni, M., De Matthaeis, E., Alonzi, A., Mattoccia, M., Omodeo, P., Rota, E. (1992). Speciation, genetic divergence and palaeogeography in the Hormogastridae. *Soil Biology and Biochemistry* **24**: 1213–1221.
- Cognetti de Martiis, L. (1914). Escursioni Zoologiche del Dr. Enrico Festa nei monti della Vallata del Sangro (Abruzzo). Nota sugli Oligocheti degli Abruzzi. Bolletino dei Musei di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Università di Torino 689 (XXIX).
- Cosin, D. D., Trigo, D., Mascato, R. (1992). Earthworms of the Iberian Peninsula. Species list and some biogeographical considerations. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(12), 1351-1356.
- Csuzdi, C., Pavlček, T., (2011). New and little known species of the genus *Martiodrilus* Michaelsen, 1936 from French Guiana (Oligochaeta, Glossoscolecidae). *Zootaxa* 3099, 57–64.
- Dalby, P. R., Baker, G. H., Smith, S. E. (1998). Competition and cocoon consumption by the earthworm *Aporrectodea longa*. *Applied Soil Ecology*, 10(1), 127-136.
- Darwin, C. (1881). The formation of vegetable mould through the actions of worms. John Murray, London, 326 pp.
- De Oliveira, T., Bertrand, M., Roger-Estrade, J. (2012). Short-term effects of ploughing on the abundance and dynamics of two endogeic earthworm species in organic cropping systems in northern France. *Soil and Tillage Research*, 119, 76-84.
- Decaëns, T., Mariani, L., Betancourt, N., Jiménez, J. J. (2003). Seed dispersion by surface casting activity of earthworms in Colombian grasslands. *Acta Oecologica* 24: 175-185.
- Díaz Cosín D. J., M.P. Ruiz, M. Ramajo, M. Gutiérrez, (2006) Is the aestivation of the earthworm *Hormogaster elisae* a paradiapause? *Invertebrate Biology* 125(3) 250–255.



- Díaz Cosín D. J., R.P. Moro, J.V. Valle, M.H. Garvín, D. Trigo, J.B. Jesús, (1996) Producción de heces de *Hormogaster elisae* en diferentes tipos de cultivos en laboratorio. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Sec. Biol.)*, 92 177-184.
- Domínguez, J., Aira, M., Breinholt, J.W., Stojanovic, M., James, S.W. and Pérez-Losada, M., (2015). Underground evolution: new roots for the old tree of lumbricid earthworms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, pp.7-19.
- Edwards, C. A., Bohlen, P. J. (1996). *Biology and ecology of earthworms*. 3rd edn. p. 426.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one*, 6(5), e19379.
- Ernst, G., Felten, D., Vohland, M., & Emmerling, C. (2009). Impact of ecologically different earthworm species on soil water characteristics. *European Journal of Soil Biology*, 45(3), 207-213.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* 125: 1–15.
- Fernández, R., Kvist, S., Lenihan, J., Giribet, G., Ziegler, A. (2014). *Sine Systemate Chaos? A Versatile Tool for Earthworm Taxonomy: Non-Destructive Imaging of Freshly Fixed and Museum Specimens Using Micro-Computed Tomography*. *PLoS ONE* 9(5): e96617.

- Fernández, R., Novo, M., Marchán, D. F., Díaz Cosín, D. J. (2016) Diversification patterns in cosmopolitan earthworms: similar mode but different tempo. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **94**, 701-708.
- Garvín, M. H., Martínez, F., Jesús, J. B., Gutiérrez, M., Ruiz, P., Díaz Cosín, D. J. (2001). Effect of *Hormogaster elisae* (Oligochaeta; Hormogastridae) on the stability of soil aggregates. *European journal of soil biology*, 37(4), 273-276.
- Gates, G.E., (1972). Burmese earthworms. An introduction to the systematics and biology of the Megadrile Oligochaetes with special reference to Southeast Asia. *Trans. Am. Philos. Soc.* 62 (7).
- Gil, R., Ramajo, M., Jesús, J. B., Trigo, D., Díaz Cosín, D. J. (2007). Influencia de *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 (Annelida, Oligochaeta) sobre la infiltración y retención de agua del suelo de una parcela de El Molar (Madrid). Un estudio de laboratorio. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección Biológica.*, 102(1-4), 13-18.
- Giribet, G., Sharma, P. P., Benavides, L. R., Boyer, S. L., Clouse, R. M., De Bivort, B. L., Schwendinger, P. J. (2012). Evolutionary and biogeographical history of an ancient and global group of arachnids (Arachnida: Opiliones: Cyphophthalmi) with a new taxonomic arrangement. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(1), 92-130.
- Goncalves-Souza, T., Diniz-Filho, J. A. F., Romero, G. Q. (2014). Disentangling the phylogenetic and ecological components of spider phenotypic variation. *PLoS One* 9: e89314.
- Haldane, J. B. (1926). On being the right size. *Harper's Magazine* 152: 424–427.
- Hawltischek O., Porch, N., Hendrich, L., Balke, M. (2011). Ecological niche modelling and ndna sequencing support a new, morphologically cryptic beetle species unveiled by DNA barcoding. *PLoS ONE*, 6(2).

- Hernández, P. (2005). Estudio de la distribución horizontal de *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) en el Molar y de los factores que le regulan, Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid.
- Hernández, P., Fernández, R., Novo, M., Trigo, D., Díaz Cosín, D. J. (2007). Geostatistical and multivariate analysis of the horizontal distribution of an earthworm community in El Molar (Madrid, Spain). *Pedobiologia* 51 13-21
- Hernandez, P., Gutierrez, M., Ramajo, M., Trigo, D., Díaz Cosin, D. J. (2003). Horizontal distribution of an earthworm community at El Molar, Madrid (Spain). *Pedobiologia* 47, 568–573.
- Hobbelen, P. H. F., Koolhaas, J. E., Van Gestel, C. A. M. (2006). Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental pollution*, 144(2), 639-646.
- James, S. W., Cunningham, R. M. (1989). Feeding ecology of some earthworms in Kansas tallgrass prairie. *American Midland Naturalist* 121: 78–83.
- James, S.W., Divina, G.B., (2012). Earthworms (Clitellata: Acanthodrilidae Almidiae, Eudrilidae, Glossoscolecidae, Ocnerodrilidae) of the coastal region of Gamba, Ogooué-Maritime Province, southwestern Gabon. *Zootaxa* 3458, 133–148.
- Jamieson, B.G.M., (1974). The indigenous earthworms (Megascolecidae: Oligochaeta) of Tasmania. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.* 26 (4) (London).
- Jervis, M. A., Boggs, C. L., Ferns, P. N. (2007). Egg maturation strategy and survival trade-offs in holometabolous insects: a comparative approach. *Biological Journal of the Linnean Society* 90: 293–302.
- Johnston, A. S., Sibly, R. M., Hodson, M. E., Alvarez, T., Thorbek, P. (2015). Effects of agricultural management practices on earthworm populations and crop yield: validation

and application of a mechanistic modelling approach. *Journal of Applied Ecology*, 52(5), 1334-1342.

Kim, Y. N., Robinson, B., Boyer, S., Zhong, H. T., Dickinson, N. (2015). Interactions of native and introduced earthworms with soils and plant rhizospheres in production landscapes of New Zealand. *Applied Soil Ecology*, 96, 141-150.

Kodandaramaiah, U. (2011) Tectonic calibrations in molecular dating. *Current Zoology*, 57, 116–124.

Kreuzer, K., Bonkowski, M., Langel, R., Scheu, S. (2004). Decomposer animals (Lumbricidae, Collembola) and organic matter distribution affect the performance of *Lolium perenne* (Poaceae) and *Trifolium repens* (Fabaceae). *Soil Biology and Biochemistry* 36 (12): 2005-2011.

Kvavadze, E., (1991). Structure of the genital setae, a clue for the taxonomy of the genus *Eisenia* (Oligochaeta, Lumbricidae). Naucno-izdatel'skij Sovet an Gruzii, Institut Zoologii, Tbilisi, Preprint. 12 pp. (In Russian with English summary.).

Kvavadze, E., (1993). A new genus of earthworms *Omodeoia* gen. nov. (Oligochaeta: lumbricidae). *Bull. Acad. Sci. Ga.* 148, 129–134.

Kvavadze, E., (1996). Shape of genital setae taxonomic character of the genus *Eisenia* (Oligochaeta lumbricidae). *Bull. Ga. Acad. Sci.* 154 (2), 297–299.

Kvavadze, E., (1997). To the phylogeny of the *Eisenia* genus (Oligochaeta, Lumbricidae) and independence of two species of Caucasian earthworms. *Bull. Ga. Acad. Sci.* 156 (1), 127–130.

Laossi, K. R., Noguera, D. C., Bartolome-Lasa, A., Mathieu, J., Blouin, M., Barot, S. (2009). Effects of an endogeic and an anecic earthworm on the competition between four annual plants and their relative fecundity. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(8), 1668-1673.

- Lavelle, P. (1988). Earthworm activities and the soil system. *Biology and Fertility of Soils* 6: 237-251.
- Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, O. W., Dhillon, S. (1997) Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology* 33: 159-193.
- Leaché, A.D., Fujita, M.K., Minin, V.N., Bouckaert, R.R. (2014). Species delimitation using genome-wide SNP data. *Syst. Biol.* 63, 534–542.
- Lee, K.E., (1959). The Earthworm Fauna of New Zealand. Government Printer, Wellington.
- Lee, K. E. (1985). Earthworms: ecology and relationships with soils and land use. Academic Press, Sydney, 411 pp.
- Lin, Y. P., Kondo, T., Gullan, P., Cook, L. G. (2013). Delimiting genera of scale insects: molecular and morphological evidence for synonymising *Taiwansaissetia* Tao, Wong and Chang with *Coccus* Linnaeus (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae). *Systematic Entomology*, 38(2), 249-264.
- Marchán, D. F., Fernández, R., Novo, M., Díaz Cosín, D. J. (2014). New light into the hormogastrid riddle: morphological and molecular description of *Hormogaster joseantonioi* sp. n. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae). *ZooKeys*, **414**, 1.
- Michaelsen, W. (1899). Revision der Kinberg'schen Oligochaeten-Type, *Öfversigt Akademiens Förhandlingar, Stockholm* **56**: 413–448.
- Michaelsen, W. (1900). Oligochaeta (Vol. 10). R. Friedländer und Sohn.
- Muir, M. A., Yunusa, I. A. M., Burchett, M. D., Lawrie, R., Chan, K. Y., Manoharan, V. (2007). Short-term responses of two contrasting species of earthworms in an agricultural soil amended with coal fly-ash. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(5), 987-992.

- Nahmani, J., Lavelle, P., Rossi, J. P. (2006). Does changing the taxonomical resolution alter the value of soil macroinvertebrates as bioindicators of metal pollution?. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(2), 385-396.
- Novo, M., Almodóvar, A., Díaz Cosín, D. J. (2009). High genetic divergence of hormogastrid earthworms (Annelida, Oligochaeta) in the central Iberian Peninsula: evolutionary and demographic implications. *Zoologica scripta*, **38**(5), 537-552.
- Novo, M. (2010). Algunos aspectos de la Biología Evolutiva de la Familia Hormogastridae Michaelson, 1900: Filogenia, Filogeografía y Selección Sexual. PhD Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Spain, 341 pp.
- Novo, M., Almodóvar, A., Fernández, R., Trigo, D., Díaz Cosín, D. J. (2010). Cryptic speciation of hormogastrid earthworms revealed by mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**(1), 507-512.
- Novo, M., Almodóvar, A., Fernández, R., Giribet, G., Díaz Cosín, D. J. (2011). Understanding the biogeography of a group of earthworms in the Mediterranean basin - The phylogenetic puzzle of Hormogastridae (Clitellata: Oligochaeta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **61**(1), 125-135.
- Novo, M., Almodóvar, A., Fernández, R., Trigo, D., Díaz Cosín, D. J., Giribet, G. (2012a). Appearances can be deceptive: different diversification patterns within a group of Mediterranean earthworms (Oligochaeta, Hormogastridae). *Molecular Ecology*, **21**(15), 3776-3793.
- Novo, M., Fernández, R., Marchán, D. F., Gutiérrez, M., Díaz Cosín D. J. (2012b). Compilation of morphological and molecular data, a necessity for taxonomy: The case of *Hormogaster abbatissae* sp. n. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae). *ZooKeys*, **242**, 1.

- Novo, M., Riesgo, A., Fernández-Guerra, A., & Giribet, G. (2013). Pheromone evolution, reproductive genes, and comparative transcriptomics in Mediterranean earthworms (Annelida, Oligochaeta, Hormogastridae). *Molecular biology and evolution*, mst074.
- Novo, M., Fernández, R., Marchán, D. F., Trigo, D., Díaz Cosín, D. J., Giribet, G. (2015). Unearthing the historical biogeography of Mediterranean earthworms (Annelida: Hormogastridae). *Journal of Biogeography*, **42**(4), 751-762.
- Omodeo, P., Rota, E. (2008). Earthworm diversity and land evolution in three Mediterranean districts. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, Fourth Series 59: 65– 83.
- Pagel, M. (1999). Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 401: 877–884.
- Parmelee, R. W., Beare, M. H., Cheng, W., Hendrix, P. F., Rider, S. J., Crossley, D.A. JR, Coleman, D. C. (1990). Earthworms and enchytraeids in conventional and no-tillage agroecosystems: A biocide approach to asses their role in organic matter breakdown. *Biology and Fertility Soils* 10: 1-10.
- Perel, T. S. (1977). Differences in lumbricid organization connected with ecological properties *Ecological Bulletins* No. 25, Soil Organisms as Components of Ecosystems, pp. 56–63.
- Phillips S. J., Anderson, R. P., Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* 190 231–259.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., Vogler, A. P. (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, **55**(4), 595-609.

- Puillandre, N., Duda, T. F., Meyer, C., Olivera, B. M., Bouchet, P. (2014). One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *Journal of Molluscan Studies*, eyu055.
- Qiu, J. P., Bouché, M.B. (1998). Contribution to the taxonomy of Hormogastridae (Annelida: Oligochaeta) with description of new species from Spain. *Documents Pedozoologiques et Integrologiques* **4**: 164–177.
- Razafindrakoto, M., Csuzdi, C., Blanchart, E., (2011). New and little known giant earthworms from Madagascar (Oligochaeta: Kynotidae). *Afr. Invertebr.* 52.2, 1–10.
- Razkin, O., Sonet, G., Breugelmans, K., Madeira, M. J., Gómez-Moliner, B. J., Backeljau, T. (2016). Species limits, interspecific hybridization and phylogeny in the cryptic land snail complex *Pyramidula*: the power of RADseq data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *101*, 267-278.
- Rosa, D. (1887). *Hormogaster redii* n. g., n. sp. *Bollettino dei Musei di Zoologia ed Anatomia comparata della Università di Torino* **32** (II).
- Rota, E. (1993). Contribution to the taxonomy of the Hormogastridae (Annelida: Oligochaeta) with description of two new species from southern France. *Journal of Natural History* **28**: 27–36.
- Rota, E., Erséus, C., (1997). First record of *Dendrobaena attemsi* (Michaelsen) (Oligochaeta, Lumbricidae) in Scandinavia, with a critical review of its morphological variation, taxonomic relationships and geographical range. *Ann. Zool. Fenn.* 34, 89–104.
- Rota, E., Marchán, D.F. Omodeo, P., (2016). *Hormogaster regina* sp. n.(Annelida: Clitellata: Hormogastridae): A giant earthworm from Spanish Catalonia, described from morphological and molecular evidence. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, **261**, pp.56-65.



- Sánchez, N., Yamasaki, H., Pardos, F., Sørensen, M.V. Martínez, A., (2016). Morphology disentangles the systematics of a ubiquitous but elusive meiofaunal group (Kinorhyncha: Pycnophyidae). *Cladistics* **32**, 479-505.
- Santos H., Juste, J., Ibáñez, C., Palmeirim, J. M., Godinho, R., Amorim, F., Albes, P., Costa, H., De Paz, O., Pérez-Suárez, G., Martínez-Alos, S., Jones, G., Rebelo, H. (2014). Influences of ecology and biogeography on shaping the distributions of cryptic species: Three bat tales in Iberia. *Biol. J. Linnean Soc.* 112(1) 150–162.
- Scheu, S. (2003). Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. *Pedobiologia* 47: 846-856.
- Sheehan, C., Kirwan, L., Connolly, J., Bolger, T. (2008). The effects of earthworm functional diversity on microbial biomass and the microbial community level physiological profile of soils. *European Journal of Soil Biology*, 44(1), 65-70.
- Sherlock, E., Csuzdi, C., (2013). Two new earthworm species from Belize (Oligochaeta: Acanthodrilidae). *J. Nat. Hist.* 47 (29-30), 1911–1919.
- Silva-Brandão, K. L., Brandão, M. M., Omoto, C., Sperling, F. A. (2015). Genotyping-by-sequencing approach indicates geographic distance as the main factor affecting genetic structure and gene flow in Brazilian populations of *Grapholita molesta* (Lepidoptera, Tortricidae). *Evolutionary applications*, 8(5), 476-485.
- Simonsen, J., Posner, J., Rosemeyer, M., & Baldock, J. (2010). Endogeic and anecic earthworm abundance in six Midwestern cropping systems. *Applied Soil Ecology*, 44(2), 147-155.
- Speratti, A. B., Whalen, J. K. (2008). Carbon dioxide and nitrous oxide fluxes from soil as influenced by anecic and endogeic earthworms. *Applied Soil Ecology*, 38(1), 27-33.

- Szederjesi, T., Pavlíček, T., Csuzdi, C., (2013). New earthworm species from Jordan (Oligochaeta, Lumbricidae). *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 59.4, 391–400.
- Szederjesi, T., Csuzdi, C., (2015). A new earthworm species and new records from Albania with remarks on the molecular phylogenetic relationships of the *Eisenia* species of the Balkan Peninsula (Oligochaeta: Lumbricidae). *North-West. J. Zool.* 11.1, 110–116.
- Talavera, G., Lukhtanov, V. A., Pierce, N. E., Vila, R. (2013). Establishing criteria for higher-level classification using molecular data: the systematics of *Polyommatus* blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae). *Cladistics*, 29(2), 166-192.
- Tejada, M., Gómez, I., Franco-Andreu, L., Benitez, C. (2016). Role of different earthworms in a soil polluted with oxyfluorfen herbicide. Short-time response on soil biochemical properties. *Ecological Engineering*, 86, 39-44.
- Valckx, J., Govers, G., Hermy, M. Muys, B. (2010). Manipulated earthworm populations decrease runoff and erosion rates in arable land with distinct soil tillage treatments. In: 9th International Symposium on Earthworm Ecology, Xalapa, Mexico
- Van Praagh, B. D., Yen, A. L. (2010). National Recovery Plan for the Giant Gippsland Earthworm.
- Vodă, R., Dapporto, L., Dincă, V., Vila, R. (2015). Why do cryptic species tend not to co-occur? A case study on two cryptic pairs of butterflies. *PloS one*, **10**(2), e0117802.
- Warren D. L., Glor, R. E., Turelli, M. (2010). ENMTools: A toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*, 33(3) 607–611. doi:10.1111/j.1600-0587.2009.06142.x
- Winsome, T., Epstein, L., Hendrix, P. F., Horwath, W. R. (2006). Competitive interactions between native and exotic earthworm species as influenced by habitat quality in a California grassland. *Applied Soil Ecology*, 32(1), 38-53.

Zhang, Q. L., Hendrix, P. F. (1995). Earthworm (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*) Effects on Carbon Flux in Soil. *Soil Science Society of America Journal* 59 (3): 816-823.

Zicsi, A. (1970). Neue Regenwürmer (Oligochaeta: Hormogastridae, Lumbricidae) aus Spanien. *Opuscula Zoologica* (Budapest) **X**: 371–373.